ANNEE 1970

N°

2E

THÈSES

PRÉSENTÉES

A L'UNIVERSITÉ DE CLERMONT FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

POUR

LE DOCTORAT EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)

Présentées et soutenues publiquement le 27 Avril 1970

par

Jean - Bernard BOYER

1ère THESE : Préparation et étude enzymopharmacologique de spirolactones carboxyliques.

2ème THESE: L'Asparaginase.

Président : Monsieur MEYNIEL, Doyen

Membres du Jury : Monsieur DASTUGUE, Professeur
Monsieur TRONCHE, Professeur
Monsieur BASTIDE, Professeur
Monsieur CLUZEL, Professeur, Suppléant

CLERMONT - REPRODUCTION , 64 , Avenue Jean Noellet - AUBIERE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548623_0018

ANNEE 1970

N°

THÈSES

PRÉSENTÉES

A L'UNIVERSITÉ DE CLERMONT FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

POUR

LE DOCTORAT EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)

Présentées et soutenues publiquement le 27 Avril 1970

par

Jean - Bernard BOYER

1ère THESE : Préparation et étude enzymopharmacologique de spirolactones carboxyliques.

2ème THESE: L'Asparaginase.

Président : Monsieur MEYNIEL, Doyen

Membres du Jury : Monsieur DASTUGUE, Professeur
Monsieur TRONCHE, Professeur
Monsieur BASTIDE, Professeur
Monsieur CLUZEL, Professeur, Suppléant

CLERMONT - REPRODUCTION , 64 , Avenue Jean Noellet - AUBIERE

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE DE CLERMONT

FACULTE MIXTE DE MEDECINE et de PHARMACIE

Doyen : G. MEYNIEL
Assesseur : M. COULET

Doyen Honoraire : M. CUVELIER Directeur Honoraire : M. MERLE

Professeurs Honoraires : Mme BLANQUET - MM. BUREAU, M. POMMÉ - M. WILLEMIN-CLOG

I - Professeurs Titulaires.

MM.	BARRIER	Clinique Chirurgicale A
	BASTIDE	Chimie Biologique et Pharmacodynamie
	BAUDON	Clinique Obstétricale
	BERGER	Chimie Analytique
	BERGERON	Pathologie Médicale
	COULET	Botanique et Microbiologie
	CUVELIER	Hydrologie et Climatologie
	DASTUGUE	Biochimie Médicale
	DAUPHIN	Chimie Pharmaceutique et Toxicologie
	DELAGE	Anatomie Pathologique
	DUCHENE-MARULLAZ	Pharmacologie
	FEBVRE	Pharmacie Galénique
Mme	GAILLARD	Physique Pharmaceutique
MM.	GERMAIN	Clinique Chirurgicale B
	GRAS	Clinique Médicale A
	JACQUEMET	Technique Chirurgicale
	JALLUT	Séméiologie Médicale
	LATAIX	Pathologie Chirurgicale
	MERCIER	Anatomie
	MEYNIEL	Biophysique Médicale
	MOLINA	Clinique Pneumo-Phtisiologique
	PETIT	Médecine Légale et Médecine Sociale
	POROT	Clinique Neurologique et Psychiatrique
	POURRAT	Matière Médicale
Melle	RAMPON	Thérapeutique
MM.	ROUHER	Clinique Ophtalmologique
	TERRASSE	Clinique Médicale B
	THIEBLOT	Physiologie
	THOMAS	Clinique Oto-Rhino-Laryngologique
	TRONCHE	Pharmacie Chimique
	TURCHINI	Histologie et Embryologie
	VAURS	Bactériologie et Hygiène

II - Professeurs titulaires à titre personnel

MM. ALFIERI	Biophysique Médicale
CHAMPEIX	Médecine Légale et Médecine du Travail
VIALLET	Electro-Radiologie

III - Professeurs sans Chaire

Melle CHATONIER	Chimie Minérale et Minéralogie
MM. CLUZEL	Bactériologie
MENUT	Pédiatrie et Puériculture
PIGNIDE	Médecine Générale
Mme POURRAT	Matière Médicale

IV - Maitres de Conférences Agrégés

MM. ANDRAUD	Toxicologie
COUQUELET	Pharmacie Chimique
Mme MOINADE	Médecine Générale et Thérapeutique
Mme PETIT	Chimie Analytique
MM. RAYNAUD	Pédiatrie
VENRIES DE LAGUILLAUMIE	Anatomie Pathologique

V - Agrégés.

MM. FOURRIER	Orthopédie
HOUDARD	Chirurgie Générale
JANNY	Neuro-Chirurgie
RENARD	Pneumo-Phtisiologie
TOURNILHAC	Neurologie et Psychiatrie

VI - Délégué dans les Fonctions de Maitres de Conférences

MM. BOUCHER	Physiologie
GENTOU	Biochimie Médicale
MALET	Histologie et Embryologie
MARCHEIX	Médecine Générale et Thérapeutique
PLAGNE	Cancérologie

Attaché Principal : M. BERTHON
Cons ervateur de la bibliothèque : M. ARCHIMBAUD

La Faculté décide que les opinions émises dans les travaux et mémoires présentées à l'occasion d'une soutenance de thèse de Doctorat en Médecine ou en Pharmacie doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation
(Délibération en date du 6 juin 1956)

A ma FAMILLE

A mes AMIS

AVANT - PROPOS

Ce travail a pu être réalisé grâce à une étroite collaboration technique entre le laboratoire de Chimie Biologique et Pharmacodynamie de Monsieur le Professeur BASTIDE et le laboratoire de Pharmacie Chimique de Monsieur le Professeur TRONCHE. Que tous les enseignants et chercheurs des deux équipes qui m'ont apporté leur concours dans la réalisation de ce travail veuillent bien accepter mes plus vifs remerciements.

Monsieur le Doyen MEYNIEL nous a toujours témoigné une bienveillante attention ; il nous a fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde et respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Professeur DASTUGUE nous a ouvert les portes de son laboratoire à la sortie de nos études. Pendant deux années nous avons fait partie de son équipe et avons pu apprécier ses qualités pédagogiques et sa grande érudition. Nous le prions de croire à notre respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur TRONCHE nous a accueilli dans son laboratoire et nous a confié le sujet de cette thèse. Nous n'oublierons jamais la bienveillance dont il fit preuve à notre égard ni l'amitié qu'il nous a d'emblée témoignée. Nous tenons à le remercier pour l'aide qu'il nous a apportée dans la réalisation de ce travail au cours duquel nous avons pu apprécier ses grandes qualités humaines et scientifiques. Qu'il soit assuré de notre sincère dévouement.

Monsieur le Professeur BASTIDE a partagé avec Monsieur le Professeur TRONCHE la direction de cette thèse dont il a en outre inspiré le deuxième sujet. Il nous a réservé dans son service l'accueil le plus chaleureux. Nous avons pu apprécier le dynamisme avec lequel il anime son équipe et sa magistrale compétence. Nous tenons à le remercier pous ses conseils diligents et la confiance qu'il a bien voulu nous accorder. Qu'il nous permette de lui exprimer notre profond attachement.

Monsieur le Professeur CLUZEL a bien voulu accepter d'être de nos juges. Nous tenons à lui exprimer notre profonde gratitude.

Nous associons ici, dans une même pensée respectueuse, tous nos Maîtres de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Clermont-Ferrand.

PREPARATION ET ETUDE ENZYMOPHARMACOLOGIQUE

DE SPIROLACTONES CARBOXYLIQUES

INTRODUCTION

La fonction lactone se rencontre fréquemment dans les composés naturels, le plus souvent sous forme d'anneaux lactoniques pentagonaux ou hexagonaux mais parfois aussi sous forme d'anneaux de grande dimension comme il arrive pour les macrolides. Le chimiste organicien dispose de son côté de procédés variés qui lui permettent d'accéder par synthèse à de nombreux composés olidiques.

La fonction lactone se rencontre dans des médicaments importants mais aussi dans des substances non utilisées en thérapeutique et cependant douées d'activité biologique. Les hétérosides cardiotoniques, certains anthelmintiques naturels, divers alcaloides et antibiotiques répondent à la première définition ; on connaît des substances cancérogènes qui répondent à la seconde définition. De plus, l'activité de ces composés semble, pour une part tout au moins, liée à l'intégrité de la fonction lactone, car elle diminue ou disparaît par ouverture du cycle olidique.

Dans notre étude bibliographique nous ne donnons qu'un bref rappel des aspects chimiques et pharmacologiques de la fonction lactone. Nous nous étendons au contraire sur les aspects moins bien connus des relations entre la fonction lactone et l'activité enzymatique.

Nos recherches personnelles dans ce domaine ont été orientées par des travaux précédents réalisés conjointement par les laboratoires de Chimie biologique et pharmaco

dynamie et de Pharmacie chimique. Ces travaux avaient montré l'influence certaine de buténolides 1-4 sur plusieurs activités enzymatiques ; mais leur poursuite s'était heurtée à des problèmes d'hydrosolubilité des composés lactoniques étudiés. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de préparer et d'étudier des acides spirolactones carboxyliques présentant le double avantage d'associer une copule solubilisante au rôle pharmacophore ou haptophore de la fonction lactone.

RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I

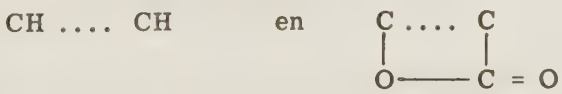
RAPPELS DE NOTIONS CHIMIQUES ET PHYSICOCHIMIQUES CONCERNANT LES LACTONES

Les traités classiques (95) nous enseignent qu'un acide alcool peut subir une estérification intramoléculaire pour donner un ester cyclique ou interne de fonction neutre, dénommé lactone ou olide (84).

Le mot lactone fut créé en 1844 par PELOUZE (158) pour désigner un liquide neutre recueilli par cet auteur parmi les produits de l'action de la chaleur sur l'acide lactique. On prétend que le corps en question ne put jamais être reproduit.

Le terme même de"lactone" est contesté par certains (94) qui estiment que la désinence " one " doit être réservée aux cétones. Les règles de nomenclature les plus récentes (176) semblent réserver le terme olide pour désigner la transformation de :

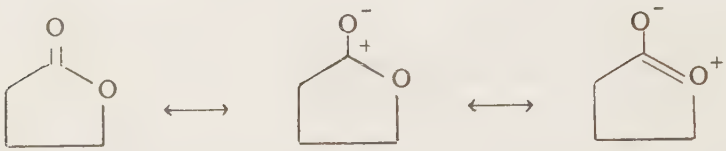
Le terme carbolactone désigne la transformation de :



un atome de carbone supplémentaire étant incorporé.

Les olides 1-4 ou γ lactones sont ceux que l'on rencontre le plus fréquemment. Ce sont aussi les plus stables. D'après FIESER (69) ce phénomène est lié au fait que

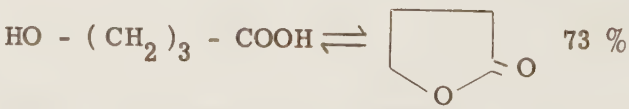
l'anneau lactonique est pratiquement plan et stabilisé par résonnance.



Méthodes générales d'accès aux olides 1-4

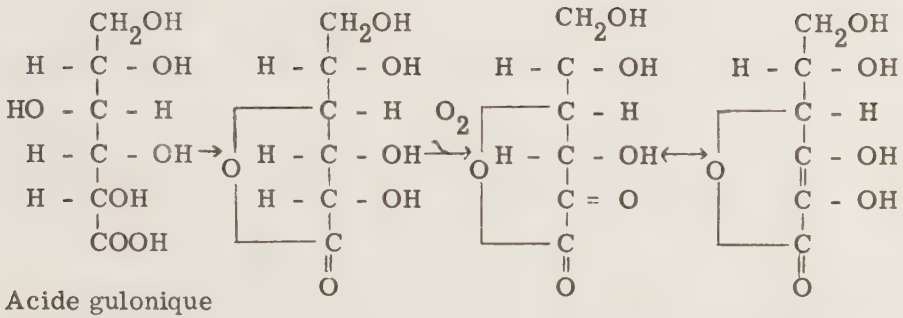
Cette question a déjà été abordée à plusieurs reprises au laboratoire (47), (221) mais la plus importante revue d'ensemble est celle de RAO (175). Ce dernier article très documenté envisage tour à tour les méthodes générales mais aussi un certain nombre de cas particuliers. Aussi nous nous bornerons à quelques commentaires sur deux voies d'accès qui se rapportent plus directement à nos recherches personnelles.

Les acides alcools 1-4 ou les esters alcools 1-4 se cyclisent spontanément par élimination d'une molécule d'eau ou d'une molécule d'alcool. La réaction réversible à froid devient totale à chaud (154). Ce procédé donne naissance à de très nombreux composés lactoniques naturels ou de synthèse dans le cas des olides 1-4, moins fréquemment dans le cas des olides 1-5, rarement dans d'autres circonstances. Nous mentionnerons deux exemples : celui de la formation de la γ butyrolactone ou butanolide-4 à partir de l'hydroxy-4 butanoïque :



Ce composé très simple joue cependant un rôle biologique important dans l'état de vigilance et de sommeil (22).

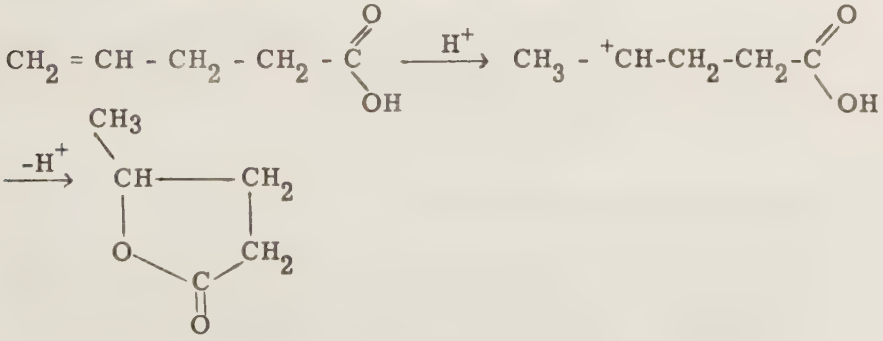
Notre second exemple sera également choisi parmi les composés d'intérêt biologique : c'est celui de la formation de l'acide L ascorbique à partir de l'acide gulonique.



Acide gulonique

Acide L ascorbique

Un deuxième mode fréquent de formation de lactone est celui qui s'opère à partir d'un acide insaturé au delà du carbone β. Dans ces conditions la double liaison et le groupement carboxyle entrent fréquemment en interaction en présence de catalyseur acide : l'ion carbonium résultant de l'addition d'un proton sur la double liaison porte son propre nucléophile, le carbonyle carboxylique qui peut attaquer le centre cationique pour donner une lactone lorsqu'un cycle à 5 ou 6 chaînons peut se former (182).

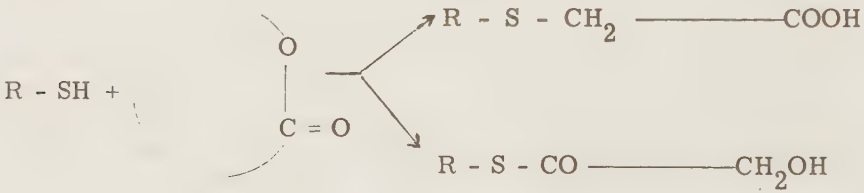


Stabilité de l'anneau lactonique.

En présence d'eau l'anneau lactonique peut s'ouvrir et donner ou redonner naissance à l'acide alcool correspondant . Cette ouverture est essentiellement influencée par le pH du milieu ou l'approche de certains réactifs. Les pH acides sont les plus favorables à l'existence de la forme lactone qui d'habitude prend naissance dans de telles conditions. Au contraire, un milieu alcalin favorise l'ouverture du

cycle lactonique. Au pH intermédiaire un état d'équilibre s'installe entre la forme cyclisée et la forme ouverte. Cette notion est importante en biologie. Par exemple l'hydroxy-4 butanoïque, fortement ionisé passe difficilement à travers la couche lipidique des membranes cellulaires, mais modifie leur perméabilité.

Le butanolide-4 peu ionisé, doué d'une certaine liposolubilité franchit plus facilement les membranes; cette observation a été faite au niveau du cerveau (42, 87), (97, 184). Parmi les nombreux réactifs susceptibles de provoquer l'ouverture de l'anneau lactonique, nous citerons en particulier les hydracides, les réactifs d'halogénation, l'hydroxylamine, les oxydants, les réducteurs, les organomagnésiens (47); on peut y ajouter les groupements thiols dont l'importance en biologie n'est pas négligeable. Deux sortes de composés pourraient se former au cours d'une telle réaction (221).



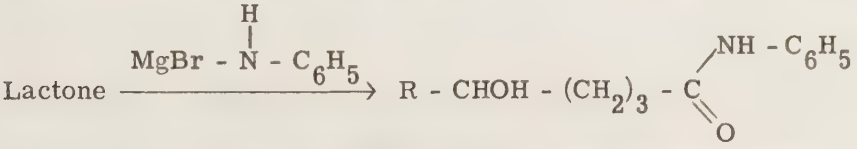
D'autres réactions peuvent s'opérer sans ouverture de l'anneau lactonique. Il s'agit en particulier de celles qui entraînent la participation d'un ou des hydrogènes activés voisins du carbonyle.

Méthodes générales d'analyse.

La réaction de caractérisation la plus répandue est celle qui consiste à transformer par action de l'hydroxylamine un composé lactonique en acide hydroxamique. Celui-ci est ensuite révélé par les ions Fe^{+++} avec production d'une coloration rouge violacée. Cette réaction peut être rendue quantitative et se prêter à des dosages colorimétriques par évaluation au spectrophotomètre au voisinage de 535m μ (164).

Une telle méthode a été préconisée pour l'analyse de médicaments à fonction lactone ; c'est la cas de la Pilocarpine (32).

Cette méthode a également été appliquée à l'identification des lactones en chromatographie sur papier ou sur couche mince par FISHBEIN et FALK (72). Ces mêmes auteurs proposent également comme procédé d'identification la transformation des lactones en hydroxy-alkyl anilides par action du bromure de phénylaminomagnésium.



Dans ce dernier cas les anilides sont identifiées par analyse IR ou chromatographie gazeuse. On trouvera également dans la revue de FISHBEIN les références d'un certain nombre de lactones dans divers solvants de migration.

Nous mentionnerons encore d'autres procédés décrits dans la littérature, mais beaucoup moins courants, d'analyse de lactones, telles la titrimétrie (183), (223), le spectre IR et la spectroscopie de masse (72).

CHAPITRE II

NOTIONS CHIMIQUES CONCERNANT CERTAINS TYPES DE LACTONES

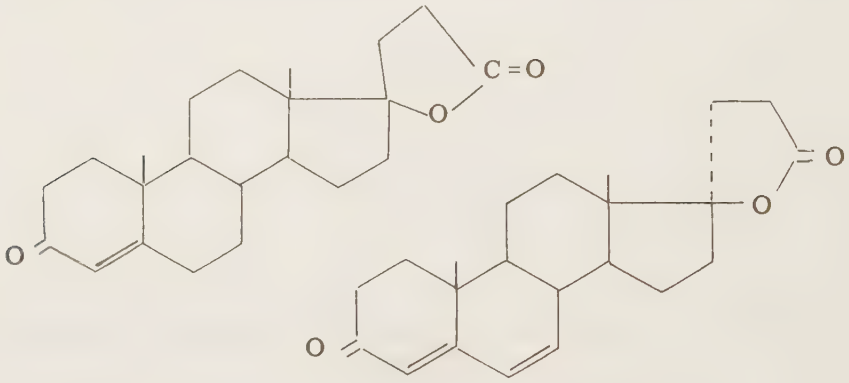
Nous limiterons volontairement notre bibliographie à quelques types de lactones dont la structure est en relation directe avec les produits que nous avons préparés. C'est ainsi que nous envisagerons seulement les spirolactones et les acides lactones carboxyliques. Nous négligerons en particulier le groupe important des cardénolides abondamment traités dans la littérature.

A - SPIROLACTONES.

C'est en série stéroide que les spirolactones ou spironolactones ont connu au cours de ces dernières années le développement le plus important. Ces composés ont été introduits en 1954 par KAGAWA et en 1958 par LIDDLE comme inhibiteurs d'aldostérone et diurétiques favorisant l'élimination du sodium. Il semble que ces stéroides de synthèse agissent par blocage de l'action périphérique de l'aldostérone et d'autres minéralo-corticoides.

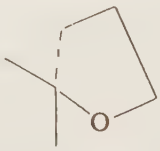
Selon STREETEN (204) une analogie de structure serait réalisée entre ces composés et la forme

hémiacétalique de l'aldostérone. Nous rappellerons ci-dessous la structure de deux produits :



Aldactone * 11614 RP **

Les travaux récents qui se poursuivent dans cette direction semblent montrer que la fonction lactone n'est pas nécessaire à l'activité et peut être remplacée par le THF, selon une structure du type :



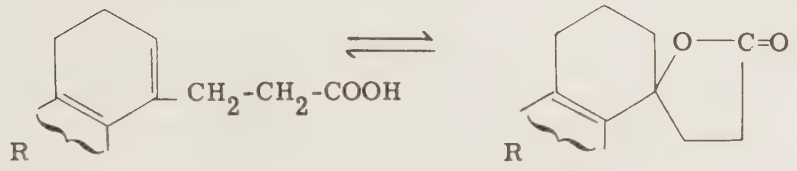
que l'on rencontre dans la spiroxasone (* * *).

L'accès à ces molécules se fait par des procédés variés dont on trouve la description la plupart du temps dans des brevets.

Mentionnons par exemple une série de lactones spirostéroides à propriétés diurétiques préparée aux Etats-Unis (39). Des spirobuténolides ont manifesté des propriétés cardiotoniques, antiinflammatoires, hypocholestérolémiantes (128), (129).

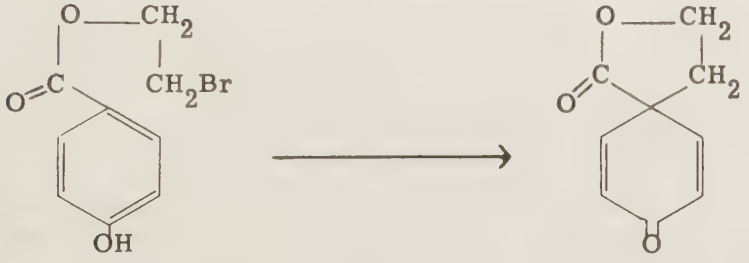
(*) ND Byla
(* *) Phanurane ND Spécia
(* **) ND Merck Sharp & Dohme

En dehors de la série stéroïde on a décrit de nombreuses spirolactones de structure plus simple. Le plus souvent la préparation de telles molécules fait appel à la réaction de STOBBE sur laquelle nous reviendrons plus loin. Nous en donnerons ici un seul exemple (112) :

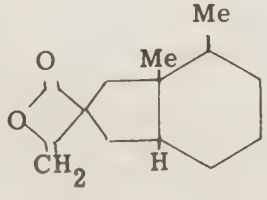


D'autres exemples sont mentionnés par JOHNSON et DAUB (109).

Des spirolactones dérivées de cyclohexadiénones ont été préparées par PLIENINGER (169) à partir de parahydroxybenzoate de βbromoéthyl ou de parahydroxyphénylacétate de βbromoéthyl. Nous indiquons ci-dessous le schéma de la première réaction :

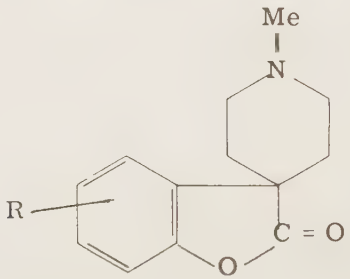


On peut rapprocher de ces structures des composés naturels sesquiterpéniques isolés par KUNIKALSU de Petasites japonicus et dénommés Bakkénolides (123).



Une autre famille de spirolactones d'intérêt pharmacologique est constituée par des dérivés dans lesquels le carbone spiranique appartient au cycle de la pipéridine et le plus souvent de la N méthylpipéridine.

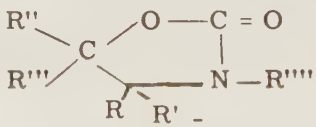
Mac DONALD (134) a étudié dans cet esprit des analogues structuraux de la Péthidine qui ont manifesté des effets dépresseurs importants sur le système nerveux central. Nous donnons ci-dessous la structure de base de ces composés :



ANKER (5) a eu moins de succès pour préparer des spirolactones assez analogues aux précédentes. Ces auteurs ont travaillé à la même période mais ne semblent pas tout à fait d'accord quant à leurs résultats chimiques et pharmacologiques.

STAMM (207) a décrit des spirolactones comportant le cycle de la pyrolidinone, composé qu'il obtient à partir d'aziridine et d'ester malonique. Dans le même esprit MIKHLINA (146) et RUBCOV (186) ont préparé des spirolactones dérivées de la quinuclidine.

L'introduction d'un atome d'azote dans le cycle lactonique donne naissance à des spirodérivés d'oxazolidinones (36) (137) de structure générale :



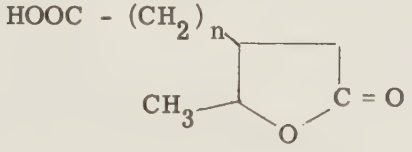
Ces composés ont un tropisme cardiovasculaire intéressant ; ils sont en outre analgésiques et tranquillisants. Cette série a été étendue à des anneaux lactoniques à six maillons réalisant ainsi des tétrahydrooxazinones (138) présentant une affinité plus marquée pour le système nerveux central et même périphérique. A noter que ces composés sont obtenus à partir de cyclanones et de βhydroxynitriles.

B - ACIDES LACTONE-CARBOXYLIQUES.

Nous commencerons par préciser un détail de nomenclature. Jusqu'à une date toute récente les acides butanolides carboxyliques ont été souvent désignés sous le nom d'acides paraconiques tandis que les acides buténolides carboxyliques figurent souvent sous le nom d'acides aconiques.

De nombreux composés peuvent être mentionnés dans ce chapitre et un classement s'avère difficile. Nous envisagerons donc quelques sous-groupes en les rangeant dans la mesure du possible par degré de complexité.

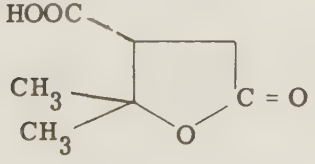
1 - Acides γméthylbutyrolactone carboxyliques).(Ac. valerolactone carboxylique).



On peut accéder à de tels composés par condensation d'un aldéhyde avec un ester α acyl succinique en présence d'un catalyseur acide ou basique (125). De tels esters et acides lactoniques sont préconisés dans la préparation de plastifiants et de médicaments.

D'autres procédés font appel à l'emploi d'oléfines que l'on fait réagir par exemple avec l'aldéhyde formique en présence d'H_2SO_4 (240) ou sur un anhydride comme l'anhydride maléique (165). Par ces méthodes ont été obtenus des composés dans lesquels le groupement carboxylique est juxta annulaire ou au contraire séparé par un groupement méthylénique .

2 - Acides γ diméthyl butyrolactone carboxyliques (ac. térébiques).



L'acide térébique et ses dérivés sont souvent obtenus à partir de composés naturels en particulier par oxydation du cinéol. KAWAMOTO a utilisé successivement comme oxydant de l'acide nitrique (116) puis du permanganate de potassium (117). Dans les deux cas les rendements sont minimes.

L'ozonisation de la Pyrocine obtenue à partir d'acides chrysanthémiques naturels fournit également de l'acide térébique (143).

On peut aussi accéder à l'acide térébique sans utiliser de composés naturels ; MAGEE (135) hydrolyse et cyclise des nitroparaffines à fonction dicarboxylique. PITTS (168) isole 50 p. 100 d'acide térébique dans les produits de photolyse d'une solution de benzophénone et d'acide maléique dans l'isopropranol. D'une façon générale, il s'agit d'une réaction d'addition d'alcool sur la double liaison des acides α - β insaturés (61) que l'on peut initier par la benzophénone et les rayons U. V. SCHENK (190) (191) a remplacé l'acide maléique par l'acide fumarique, l'isopropanol par le butanol-2 et la benzophénone par l'anthraquinone . TERMAN délaisse la réaction photochimique au profit de l'emploi de percarbonates (216). LIPP et DALLACKER se sont intéressés à l'acide térébique, mais surtout comme intermédiaire dans la préparation de dérivés de la fonction acide carboxylique (131) ou pour juxtaposer l'anneau lactonique à des ensembles hétérocycliques (50).

3 - Méthodes générales d'accès.

Il semble que l'on puisse grouper les voies d'accès aux acides aconiques et paraconiques et à leurs esters autour de trois méthodes principales comme le signale GASTAMBIDE (76).

- La méthode connue sous le nom de CHUGAEV-ZERETINOV qui fait appel au diester de l'acide α alcoyl α halogéno succinique que l'on traite par des monocétones et par un métal activé.

- La condensation de STOBBE sur laquelle nous nous étendrons plus loin.

- La condensation de FITTIG.

GASTAMBIDE (26), (77), (78), (79) s'est attaché à la première méthode dont il a précisé les modalités réactionnelles : emploi de monocétones, utilisation du zinc, du cadmium ou du magnésium comme métal activé, présence de catalyseur, température de 80 à 100° C. Les produits normaux de cette réaction sont des esters d'acides paraconiques, mais on observe souvent une réaction secondaire qui peut devenir plus importante : cette réaction serait une hydrogénolyse des esters d'acides paraconiques en esters d'acides saturés.

On peut rapprocher de ces méthodes la cyclisation par DIXON d'un diester succinique en buténolide acide (59). Plus complexe, mais non moins intéressante, est la réaction décrite par SHAKHMAZARYAN (198) qui obtient avec des rendements de 80-90 p. cent des butyrolactones acides substituées en α, à partir d'acides γ-γdichloro-alkyl-acétiques.

C'est en fait l'emploi de diesters succiniques ou de leurs dérivés qui est à la base de la plupart des méthodes et qui fait l'objet de nombreuses variantes expérimentales. PISKOV (167) part de l'éthoxycarbonyl succinate de diéthyl qu'il condense avec le paraformaldéhyde en présence d'éthylate de sodium dans l'éthanol. Ses rendements dépassent 95 p. 100 . MIKAILOV (145) obtient des acides benzyl-4 paraconiques en condensant dans les mêmes conditions le benzyl-4 succinate de diéthyle et le formiate d'éthyle. NIKISHIN (153) a des rendements variables allant de 15 à 70 p. 100 dans la condensation d'alcools avec le maléate de diméthyle.

BOBRANSKI (31) fait réagir dans l'éthanol absolu en présence d'éthylate de sodium, l'éthyl malonate de diéthyle avec l 'oxyde de propylène.

C'est encore par condensation d'un diester succinique substitué avec le bromacétate de méthyle en présence de méthylate de sodium, puis réduction par le borohydrure de sodium que KATO (114) synthétise un acide lactone carboxylique porteur d'une chaîne triméthoxyphénéthyl.

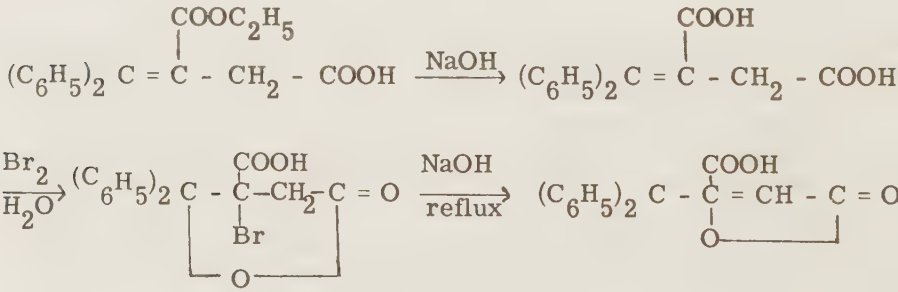
Enfin, SOLIMAN (203) croit avoir obtenu des acides lactones carboxyliques en cyclisant en présence d'acide sulfurique concentré des esters phényl acéto-acétiques substitués.

On trouve encore diverses éthoxycarbonyl γ butyrolactones décrites dans des brevets internationaux (133).

La condensation des diesters avec des aldéhydes et cétones prend classiquement le nom de réaction de Stobbe. On trouvera dans une revue de JOHNSON (109) une étude d'ensemble sur les modalités de cette réaction et sur son champ d'application. STACY (205) condense la cyclohexanone et l'acétone avec l'oxalate de diéthyle mais n'obtient que des rendements faibles ou tout au plus médiocres.

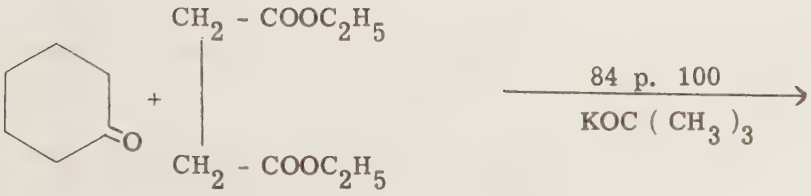
Parmi les réactions qui ont retenu notre attention nous citerons la méthode de JEFFERY et FRY (108) qui permet d'accéder aux acides butanolide-carboxyliques à partir desquels les auteurs préparent les lactones insaturées correspondantes.

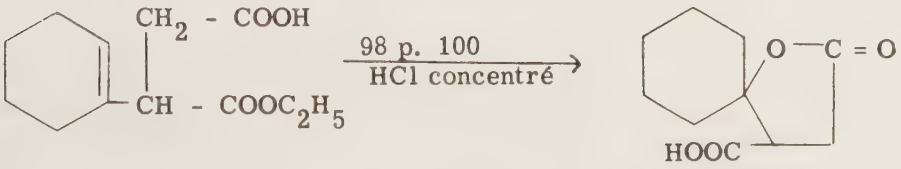
La réaction est la suivante à partir de l'hémiester obtenu par condensation de la benzophénone avec le succinate de diéthyle :



Cette méthode a été transposée par les auteurs à la préparation de composés marqués à l'oxygène 18.

Nous avons personnellement utilisé deux techniques que nous discuterons dans la partie expérimentale. La première est celle de JOHNSON (110) qui prépare un acide spirolactone carboxylique saturé en condensant à chaud la cyclohexanone avec le succinate de diéthyle en présence d'une base forte : le tert-butylate de potassium au sein du tert-butanol. L'hémiester intermédiaire est isolé et cyclisé en présence d'acide chlorhydrique concentré.

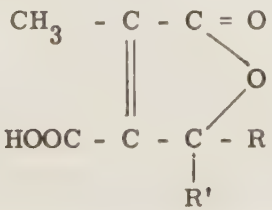




ELLIOT (64) propose une variante de la cyclisation en traitant l'hémiester par le chlorure stannique dans le benzène.

La seconde est celle de KATSUTA (115) qui permet d'accéder à des acides spirolactones carboxyliques insaturés en une seule étape.

Le diester succinique est ici remplacé par un diester de l'acide itaconique, ce qui a pour conséquence d'introduire un groupement méthyl sur l'anneau lactonique. La condensation a lieu ici à froid; dans l'éther anhydre, en présence d'une base moins forte, l'éthylate de sodium. Cette méthode est applicable à de nombreuses cétones et les composés obtenus sont du type :



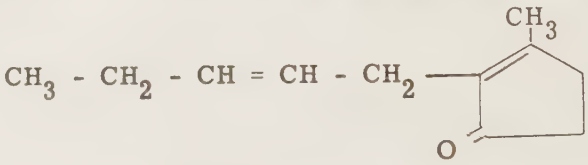
Par réduction à l'amalgame de sodium, l'auteur accède aux butanolides.

4 - Dérivés des acides paraconiques et propriétés.

Les acides paraconiques ont été utilisés comme produits intermédiaires de synthèse. Par exemple KLOTZER

(121) après avoir préparé des acides nitro-4-phényl-2 paraconiques dans l'anhydride acétique à partir du disuccinate de potassium et du p. nitrobenzaldéhyde, les convertit en chlorures d'acide et azides.

En traitant par l'acide polyphosphorique des acides paraconiques convenablement alcoylés, SHISHIDO prépare les cyclénones du groupe de la jasmone (200) (201).



TAKEDA (213) fait réagir des esters paraconiques avec des aldéhydes aromatiques en vue d'obtenir des acides benzylidène paraconiques.

Stéréoisomérie des acides paraconiques.

Les acides paraconiques posent des problèmes de stéréoisomérie dont l'étude a été abordée récemment par quelques auteurs. TOCANNE et ASSELINEAU (219) ont démontré la configuration R pour l'acide (+) paraconique non substitué. Les acides substitués peuvent comporter 1 ou 2 autres carbones assymétriques supplémentaires. L'obtention sélective de racémiques ou de stéréoisomères a été envisagée par quelques auteurs : le dédoublement a été réalisé sous forme de sels de strychnine ou de brucine (144) (171).

5 - Acides oxo paraconiques et dérivés.

On désigne sous ce nom des acides paraconiques comportant dans leur cycle une seconde fonction carbonylée, fréquemment cette seconde fonction se rencontre en α du carbonyle lactonique.

De tels composés ont été étudiés depuis une vingtaine d'années par GAULT comme intermédiaires dans la synthèse de résines thermoplastiques. Par halogénation et rupture du cycle, ils conduisent en effet à des esters haloacryliques qui se polymérisent rapidement. La voie d'accès principale réside dans l'hydroxycarbonylation des esters oxaloacétiques. GAULT (80) (81) a obtenu des esters d'acides

oxo-2 paraconiques en faisant réagir une solution aqueuse de formol à 30 p. 100 sur l'énolate potassique d'un diester oxalo-acétique. Les composés sont ensuite halogénés puis décomposés par les agents alcalins pour donner des esters acryliques. La stabilité des esters oxo-2 paraconiques vis-à-vis des agents d'hydrolyse alcaline a d'ailleurs été étudiée, tant en ce qui concerne les esters eux-mêmes que leurs dérivés mono ou polysubstitués (91) (92).

Ces esters peuvent servir de point de départ à de nouvelles synthèses et même de voie d'accès à des hétérocycles azotés. GHILARDI et GAULT (86) font réagir des organo-magnésiens en vue d'alcoyler l'anneau lactonique. En condensant l'urée avec le sel d'ammonium des esters oxo-paraconiques, GAULT (82) et SUQUET (212) obtiennent des acides oxo-2 tétrahydropyrimidine dicarboxyliques 5, 6.

Quant au mécanisme des réactions d'hydroxy carbonylation (93), il semble comporter les étapes suivantes : l'aldéhyde hydraté se fixe sur la double liaison énolique de l'ester oxaloacétique et par élimination d'eau, il se forme un cétol. Ce dernier peut subir une transestérification interne pour donner l'acide oxo-paraconique.

La réaction telle qu'elle vient d'être décrite peut être étendue à d'autres aldéhydes. STACY (206) accède ainsi à des esters oxo-paraconiques alcoylés en position γ sur l'anneau lactonique.

Les modifications peuvent également porter sur le choix de l'ester : c'est ainsi que ELKIK (63) remplace l'ester oxalo-acétique par l'oxalo-acétyl glycolate d'éthyle.

Enfin certains auteurs ont fait réagir sur les esters oxo-paraconiques différents composés aminés (104).

6 - Structures apparentées.

Nous avons traité essentiellement dans les lignes précédentes des acides paraconiques ou aconiques proprement dits. On trouve cependant dans la littérature quelques cycles analogues de dimension plus petite ou plus grande. Au premier schéma répond un dérivé du cyclopropane préparé par HARPER (100). Au deuxième type appartiennent des dérivés à 6 maillons préparés par FALBE (67) et des cycles de grande dimension comportant de 7 à 13 atomes de carbone obtenus par STOLL (210).

CHAPITRE III

INTERET BIOLOGIQUE DES LACTONES

A - ENZYMOLOGIE -

Nous avons tout d'abord recherché dans la littérature les travaux concernant l'effet de composés lactoniques sur des réactions enzymatiques. Une telle entreprise s'est avérée sans succès. Les seules études publiées semblent concerner les cardénolides et en particulier l'ouabaïne. Il s'agit presque toujours de recherches concernant l'action de ces produits sur l'ATPase membranaire comme dans des travaux de REPKE (179), WOLFF (239) et EVANS (66). L'hypothèse émise par REPKE et reprise par WOLFF serait que le groupement carbonyle lactonique sert d'accepteur de protons pour former une liaison hydrogène avec l'ATPase de transport. Mais, pour WOLFF il pourrait exister un autre mécanisme, l'addition d'un nucléophile sur la double liaison de la lactone insaturée. Les groupements thiols de l'enzyme se comporteraient à cet égard comme des nucléophiles soufrés.

Au contraire, EVANS travaillant sur la Mg^{++} et la Ca^{++} ATPase d'Echerichia Coli, observe peu de modifications enzymatiques en présence d'ouabaine.

WEATHERALL (233) ajoute que la saturation de l'anneau lactonique dans les glycosides cardiaques retentit sur le transport des ions de la même manière qu'elle influence l'activité cardiaque. Pour GLYNN (90) tous les

glycosides et toutes les génines inhibant la K^+ Na^+ ATPase présentent une lactone insaturée liée au carbone 17. Une perte d'activité totale ou partielle est entrainée par saturation de l'anneau lactonique.

Enfin MARCOLLET (140) rapporte des variations des activités ATPasique et lactatedéshydrogénasique dans le coeur et le sang de rat sous l'influence du digoxoside.

Des études toutes récentes de NEUFELD (152) distinguent dans l'ATPase deux sites actifs, dont un seul serait sensible à l'influence de l'ouabaine.

En dehors des cardénolides, des composés lactoniques de poids moléculaire plus faible, tels que des butyrolactones substituées, l'angélicalactone, la patuline et l'isopatuline, ont manifesté des effets inhibiteurs sur l'activité enzymatique de l'uréase (4), alors que la déhydroisopatuline diminue fortement les activités ATPasique et cholinestérasiques (15).

D'autre part la benzyl-2-amino-5 γ valérolactone inhibe les cholinestérases du plasma humain (202).

Des études plus nombreuses concernent l'hydrolyse des lactones et plus particulièrement des lactones impliquées dans le métabolisme glucidique. Bien qu'assimilées à des esters internes, les lactones ne semblent pas se comporter comme des substrats ordinaires pour les estérases et leur hydrolyse est catalysée par une variété d'enzyme désignée sous le nom de lactonases (161).

Deux classes de lactonases semblent aujourd'hui différenciées : celles qui ouvrent le cycle des acides uroniques cyclisés ou uronolactonases, celles qui hydrolysent les acides aldoniques cyclisés ou aldonolactonases. La spécificité semble assez grande au sein de chacune de ces catégories puisqu'un même substrat peut être considérablement dégradé par l'aldonolactonase et laissé intact par l'uronolactonase ou réciproquement.

Parmi les lactonases nous mentionnerons la gluconolactonase (3. 1. 1. 17) (13), présente dans Azotobacter vinelandii qui s'attaque à plusieurs substrats tels que la D-glucono δ lactone, la D-glucono γ lactone, la 6-Phosphogluconolactone, la D-galactono γ lactone. Elle agit à un pH optimum de 6,0 et requiert la présence impérative d'un ca-

tion divalent : Co^{++}, Mg^{++} ou Mn^{++}. Une glucuronolactonase a été découverte en 1956 dans le foie de rat : elle est présente dans les microsomes mais non dans la fraction soluble. On aurait retrouvé cette enzyme dans le foie d'autre mammifères.

Une aldonolactonase (3. 1. 1. 18) ouvre le cycle de la γ gulonolactone en acide gulonique. Cette enzyme accepte cependant pour substrat d'autres aldonolactones comportant notamment 5 à 7 atomes de carbone.

FISHBEIN et BESSMAN (70) (71) ont récemment retiré du foie de rat et du plasma humain, une lactonase capable d'hydrolyser les composés renfermant quatre à huit atomes de carbone. Cette enzyme localisée dans les microsomes est solubilisée par le desoxycholate. Un fractionnement au sulfate d'ammonium permet de la séparer des autres estérases et de la purifier. L'activité de cette lactonase est inhibée par l'E. D. T. A et le para chloromercuribenzoate. Elle est, par contre, insensible à l'action du fluorure de sodium et des inhibiteurs de cholinestérases.

Ces auteurs n'ont trouvé aucune activité lactonasique dans le cerveau, la rate, le rein et le coeur de rat bien que cette enzyme soit présente dans le sérum de cet animal.

Un fait intéressant est l'action réversible de la lactonase extraite par FISHBEIN : à un pH de 8,6 ,l'action hydrolytique est optimale ; à un pH de 6,0 , la lactonase catalyse au contraire la cyclisation des γ hydroxyacides correspondants. Il est aussi à noter que cette γ lactonase est pratiquement sans action sur les esters aliphatiques tels que l'acétylcholine.

Les cations bivalents : calcium, magnésium, zinc, cuivre, cobalt, semblent utiles, sinon indispensables, à l'action de cette lactonase, mais l'effet des ions métalliques est différent suivant le pH et le sens de la réaction.

D'autres lactonases plus spécifiques encore ont été signalées : l'existence des thiolactonases est encore hypothétique (161) mais on a découvert dans Actinoplanes missouriensis deux variétés de lactonases, dont l'une hydrolyse d'une façon plus spécifique l'Actinomycine tandis que l'autre hydrolyse également d'autres antibiotiques peptidiques, telle que la Staphylomycine (162). Nous nous permettons de faire à ce propos un rapprochement entre les lactonases et les β

lactamases qui elles, provoquent l'ouverture par hydrolyse du cycle lactame des pénicillines et des céphalosporines.

Une protéase pancréatique douée d'activité estérasique, l'alphachymotrypsine peut hydrolyser des lactones. TOBIAS (218) a réalisé une étude poussée de la réaction en utilisant les lactones des acides nitro-5 hydroxy-2 phénylacétique et nitro-5 hydroxy-2 phénylpropionique. Non seulement l'enzyme provoque l'ouverture des cycles lactoniques, mais le chromophore ainsi libéré s'unit à l'enzyme par une liaison covalente. L'auteur admet que cette liaison s'effectue au niveau du site actif de l'enzyme, tout au moins en ce qui concerne le premier composé. Les enzymes acylées auraient du reste perdu leur activité catalytique vis-à-vis de l'ester méthylique du N-acétyl L tryptophane.

D'autres aspects de la biochimie des lactones sont ceux qui concernent leur liaison aux macromolécules biologiques. Nous reviendrons sur ce problème un peu plus loin, à propos des effets cancérogènes. Nous ferons simplement ici mention de l'intéraction des butyrolactones et des composés sulfhydrylés du foie de rat étudiés par ANDRAUD (4) et de la liaison de la β propiolactone à l'A D N de la peau de souris, étudiée par COLBURN (44). Des recherches au niveau de la cellule végétale ont été réalisées avec divers types de lactones par ANDRAUD (3) qui a observé une influence notable de certains composés sur l'exosmose des pigments de Beta vulgaris.

B - PHARMACOLOGIE -

Les activités pharmacodynamiques rencontrées dans les composés lactoniques sont nombreuses et variées. L'influence des substituants ou des systèmes cycliques et polycycliques associés à un butanolide ou à un buténolide, jouent d'ailleurs souvent un rôle prépondérant. Il est par suite difficile d'opérer des rapprochements rationnels entre les divers types de composés lactoniques, en vue de les faire entrer dans telle ou telle classe pharmacodynamique.

La première revue d'ensemble sur l'activité physiologique des lactones paraît devoir être attribuée à HAYNES en 1948 (101). Cet auteur propose une classification en six groupes des composés lactoniques insaturés :

- Les inhibiteurs de la croissance des tissus animaux.
- Les antibiotiques.
- Les inhibiteurs de la germination et de la croissance des végétaux.
- Les insecticides.
- Les cardiotoniques.
- Les substances non classées (Anthelmintiques, modificateurs de la coagulation .)

Cette question a été reprise en 1967 dans deux documents déjà cités dans notre travail (47), (221). Nous en reproduisons ci-dessous les principaux passages, en les complétant par quelques informations plus récentes. Nous insisterons plus spécialement sur les propriétés des spirolactones et de quelques-uns de leurs analogues structuraux.

1) - Activité cardio-vasculaire

Il s'agit principalement des génines d'hétérosides naturels appartenant à plusieurs types : les cardénolides, stéroides à vingt-trois atomes de carbone et à cycle buténolide ; les bufadiénolides et les scilladiénolides, stéroides à 24 atomes de carbone et à cycle lactonique hexa-atomique diinsaturé.

Au premier type appartiennent les hétérosides de la Digitale pourpre et de la Digitale laineuse (Scrofulariacées), des Strophantus (Apocynacees), du Muguet (Liliacées), de l'Adonis (Renonculacées), du Laurier rose, du Thevetia neriifolia. C'est encore à ce type que se rattachent les glycosides cardiotoniques de découverte récente, tels le Gomphoside de Gomphocarpus fructicosus ou le Graciloside de Strophantus gracilis.

Au troisième type appartiennent divers hétérosides de Liliacées tels ceux de la Scille, de l'Hellebore, des Bowieia.

Les modèles naturels ont donné lieu à des imitations : modifications apportées à la structure de composés naturels (237), préparation d'analogues structuraux de synthèse à tropisme cardiovasculaire, mais de structure plus simple (34) (175). Certains de ceux-ci, simples phénylbuténolides (192), exercent in vitro et in vivo une activité cardiotonique et vasodilatatrice importante. Les hypothèses concernant le mode d'action des cardénolides et des substances apparentées semblent fréquemment impliquer une liaison avec l'ATPase de transport (238).

Ce mécanisme séduisant n'est peut-être pas définitif puisque WOLFF (239) considère par ailleurs que le cycle lactonique n'est pas un élément essentiel dans l'activité cardiotonique, contrairement à des affirmations antérieures.

On peut rapprocher de l'action sur le coeur les effets exercés par certains composés naturels pour la plupart δ lactoniques, sur la paroi vasculaire et la crase sanguine. Ainsi l'Esculetol et son glucoside l'Esculoside, possèdent à un degré remarquable une action vitaminique P : ils diminuent la perméabilité des vaisseaux capillaires et augmentent la résistance de leur paroi. Il en est de même pour son isomère le Daphnoside et d'un dérivé méthoxylé : le Fraxoside.

Un autre rapprochement peut être fait avec la coumarine et ses dérivés, dont un certain nombre manifeste des propriétés anticoagulantes.

Une lactone coumarinique insaturée de synthèse, le carbochromène (*) (54), présente un effet vasodilateur coronarien important qui lui confère une place intéressante dans le traitement de l'angine de poitrine.

2) - Activité sur le système nerveux central -

Cette étude concerne essentiellement les propriétés hypnogènes de la γ butyrolactone. L'injection de ce produit chez l'animal, provoque un abaissement de la vigilance allant jusqu'à l'abolition des réflexes de posture et l'apparition du sommeil (22). Chez l'Homme, c'est le produit d'hydrolyse de la γ butyrolactone qui est utilisé (**) sous forme de γ hydroxy butyrate de sodium, comme anesthésique intraveineux atoxique (21). Les avantages de ce produit résident dans l'absence de dépression respiratoire et de défaillance circulatoire, l'absence d'atteinte hépatique ou rénale.

Ce sommeil diffère du sommeil physiologique, mais aussi du sommeil induit par les barbituriques. Le réveil est rapide. Le mécanisme de l'action centrale de la γ butyrolactone et de l'acide hydroxybutyrique, leur métabolisme et leur distribution dans l'organisme, ont fait l'objet d'études pharmacologiques (12) (185).

(*) Intensain N. D. Delagrange

(**) Gamma OH N. D. Equilibre Biologique S. A.

Nous traiterons plus loin des oxazolones récemment étudiées pour leurs propriétés sur le système nerveux central et qui peuvent être considérées comme des analogues structuraux de la butyrolactone. HANO (98) (99) s'est livré à une étude minutieuse de l'action sur le cortex et les noyaux gris de la butyrolactone elle-même, de ses dérivés substitués et de ses analogues structuraux. Il a recherché des corrélations entre des structures et des effets hypnosédatifs, tranquillisants et convulsiviants.

On peut rattacher à ce chapitre l'action antalgique signalée pour certaines lactones, comme par exemple, le composé polycyclique extrait d'Helenum amarum (Composées) actif par voie orale (228).

Les lactones coumariniques présentent parfois une action hypnosédative : elle a été retrouvée dans de nombreux dérivés synthétiques de l'acide coumarine-carboxylique-3 et des dérivés naturels, tels que le Bergaptène ou la Pimpinelline (101).

Les propriétés hypnosédatives de la butyrolactone peuvent être renforcées par introduction de groupements uréides et donner naissance à des composés à effet antiépileptique (30).

3) Activité antibactérienne et antivirale.

Le plus simple des composés lactoniques, la propiolactone, est connue pour ses effets antibactériens qui sont à l'origine de son emploi comme agent conservateur, dans les solutés pharmaceutiques pour usage externe. Ce composé possèderait également une action virulicide, notamment contre la variole, la fièvre jaune et la psittacose (53), ainsi qu'envers certains arborvirus qui infectent le sérum et le liquide ascitique de souris immunes (18).

On trouve chez les végétaux supérieurs des composés lactoniques à activité antibactérienne ; le plus souvent cette activité demeure assez modeste et les composés qui en sont responsables ont des structures tantôt simples, comme l'acide p. sorbique, l'angélicalactone, la protoanémonine, tantôt plus complexes, comme l'ombelliferone, la fulvoplumiérine, l'arctiopicrine. La protoanémonine est à la fois bactériostatique (10), tuberculostatique (60), fungistatique (29), antivirale et antiprotozoaire (220). L'ombelliferone ou hydroxy-7 coumarine agirait sur Brucella abortus et Brucella melitensis (62). Quant à la plumericine et à la fulvoplumiérine, leur action serait du type tuberculostatique (96) (132).

Une substance très intéressante, à la fois par sa structure et ses propriétés antibactériennes, est l'antibiotique découvert en 1942 auquel on a donné les noms de patuline, expensine, clavacine, mycoïne. Son action irritante et ses effets nécrotiques sur les tissus, l'ont fait rejeter en thérapeutique humaine (208). Il inhibe cependant le développement de nombreux germes gram positifs et gram négatifs à des dilutions comprises entre 1/40 000 et 1/160 000. Il est également doué d'une forte activité antifungique vis-à-vis des espèces pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes.

Des γ lactones α aminées et substituées par des groupements méthyl ou pentyl, auraient fait preuve d'une importante activité antibactérienne (68). Des résultats moins favorables ont été retrouvés au laboratoire (48) dans le cas d'amino butanolides et buténolides comportant un cycle aromatique.

Il faut faire une mention spéciale pour les antibiotiques appartenant au groupe des Macrolides. Il s'agit de molécules de structure complexe comportant des anneaux lactoniques de grande dimension (12 à 20 atomes de carbone), auxquels sont associés des composés osidiques et des osamines.

Les macrolides interfèrent au niveau de la synthèse protéique en inhibant l'activation des amino-acides, leur fixation sur l'A R N de transfert, la fixation de l'A R N messager sur les ribosomes et l'association des sous-unités 30 s et 50 s de l'A R N ribosomal (139).

4) Activité anthelmintique.

Les propriétés vermifuges de la Santonine sont trop connues pour revenir longuement sur celles-ci. Elles disparaissent par ouverture de son cycle lactonique. L'Hélénine ou Alantolactone, retirée des racines d'Inula Helenium, serait supérieure à la Santonine par son action anthelmintique et de toxicité moindre (106).

La coumarine a servi à la préparation de dérivés synthétiques à propriétés vermifuges (107).

5) Activités diverses.

Elles sont nombreuses et variées, mais leur dispersion dans la littérature rend difficile leur recensement,

une même lactone peut également posséder des activités secondaires, à côté de son activité principale. L'anémonine, citée plus haut, possède des propriétés rubéfiantes, anti-catarrhales, anti-tussives et analgésiques de la sphère utéro-ovarienne. L'Hélénine est également un expectorant. Les dérivés de la lactone de l'acide résorcylique, largement répandus dans les champignons inférieurs, possèdent des propriétés oestrogéniques (148). Il existe également des analogues structuraux de synthèse des androgènes anabolisants, dans lesquels le cycle A est remplacé par un anneau penténolide (37).

L'action sur la sphère digestive est fréquente dans de nombreux composés lactoniques. Le goût amer présenté par de nombreuses lactones d'origine végétale (47) est susceptible d'applications médicinales : ainsi en est-il de l'action excito-secrétoire des glucosides de la gentiane sur la muqueuse gastrique. L'Himéchromone (*) dérivée des Ombelliferones, l'Ovatodiolide principe actif de Labiacées des Hauts Plateaux du Vietnam (105) sont l'une et l'autre des substances douées d'activités cholérétiques et spasmolytiques.

Nous ne saurions oublier les effets parasympathomimétiques d'un alcaloide bien connu et utilisé en médecine humaine : la Pilocarpine.

La Thioxolone (**), qui possède la structure d'une benzothiolactone, est une substance kératolytique et hypérémiante préconisée dans le traitement des séborrhées.

On trouve dans les glandes sébacées et sudoripares de certains animaux mâles, tels que le daim, des butanolides substitués par des chaînes insaturées dont l'odeur attire la femelle (33).

Il serait intéressant d'examiner le rôle des lactones en physiologie végétale (166) mais ce serait sortir du cadre de nos travaux. Nous rappellerons seulement l'action des Gibbérellines sur la croissance et la germination et

(*) Cantabiline N. D. Medicia

(**) Gélacnine N. D. Furt.

l'effet accélérateur de l'Ombelliferone et certaines autres lactones sur l'activité auxine oxydasique. Inversement, les champignons inférieurs élaborent des lactones toxiques, les effets de certaines d'entre elles, comme l'Ochratoxine (194) sont encore mal connus, d'autres comme les Aflatoxines sont des substances cancérigènes dont nous rapportons les effets ci-dessous.

6) Effets cancérigènes des lactones.

Les travaux les plus importants sur ce sujet sont ceux de DICKENS (55) (57) (58) et de VAN DUREN (229). Ces auteurs ont étudié des lactones de configuration simple telles que la propiolactone, le butanolide, le buténolide et leurs dérivés de substitution. Ils ont recherché des relations entre le pouvoir cancérigène et la structure chimique, la réactivité vis-à-vis de certains composés, en particulier sulfhydrylés, la facilité d'hydrolyse et l'hydrosolubilité.

Ils ont aussi étendu leurs recherches à des composés lactoniques plus complexes appartenant à la famille des furocoumarines et connus sous le nom d'Aflatoxines. Ces substances hautement cancérigènes sont élaborées par une moisissure banale, l'Aspergillus flavus, qui parasite en particulier les tourteaux d'arachide. Elle serait à l'origine du cancer hépatique primitif fréquent dans certaines populations africaines. Elle serait aussi responsable d'une maladie qui a décimé les élevages de volailles nourris aux tourteaux d'arachide vers 1960. Les animaux présentaient des lésions de nécrose hépatique (56) (142) (187) (217). Plus récemment ont été synthétisées des lactones polycycliques, présentant des analogies structurales avec les Aflatoxines (25). Certains de ces composés, injectés à la souris, se sont même révélés hautement cancérigènes (124).

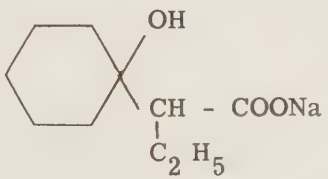
Des mécanismes d'action ont été évoqués : pour DICKENS, les composés lactoniques induiraient des aberrations chromosomiques et des mutations génétiques. TAUBMAN (215) a montré que la βpropiolactone avait une activité spécifique sur certains amino-acides, en particulier la méthionine.

On trouve cependant chez les composés lactoniques et paradoxalement, des produits doués d'activité antitumorale : ainsi en est-il d'un certain nombre de coumarines

naturelles présentes principalement dans les Ombellifères et étudiées en U. R. S. S. par TSEMLIN (222). Un antibiotique dénommé acide tenuazonique, isolé en 1967, que l'on peut considérer comme un analogue structural azoté de l'hydroxybuténolide, inhiberait la croissance de tumeurs chez les rongeurs et chez l'Homme (199). Des lactones bicycliques ont été préparées par NELSON (151) à partir d'acides tétralone carboxylique et tétralone acétique, en vue de déterminer leur effet antitumoral. Ces derniers résultats ne sont pas encore publiés.

7) Les spirolactones.

Nous distinguerons dans ce chapitre trois classes de composés : les spirolactones de structure simple, les spirolactones de la série stéroidique désignées aussi sous le nom de spironolactones et les analogues structuraux des spirolactones comportant dans le cycle olidique un atome d'azote. Dans le premier sous-groupe peu de composés ont été étudiés en pharmacodynamie. On peut cependant rapprocher de ce type de structure le cyclobutyrol sodique (*) qui peut être considéré comme la forme ouverte (acide alcool) de la spirolactone correspondante :



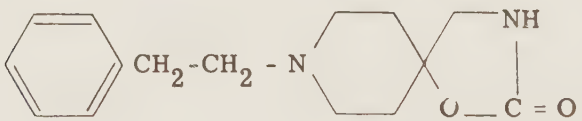
Ce composé est un cholérétique puissant dénué de toxicité.

Les investigations les plus importantes concernent le groupe des spironolactones. Ces composés sont des inhibiteurs périphériques de l'aldostérone, stéroide qui possède l'action la plus intense sur le métabolisme du sodium et du potassium. L'aldostérone augmente la réabsorption du sodium au niveau du tube rénal distal, en même temps qu'elle favorise l'excrétion urinaire du potassium. De nombreuses recherches ont été consacrées à la synthèse d'analogues structuraux de l'aldostérone, susceptibles d'entrer en compétition avec l'hormone naturelle au niveau du tube rénal. Depuis 1956, la famille des spirolactones a fourni des composés actifs par

(*) Hebucol ND Logeais

voie buccale et d'activité antialdostérone élevée. Deux composés sont commercialisés en France : la Spironolactone (*) et le 11.614 RP (* *). Nous avons indiqué plus haut la structure de ces deux produits et évoqué leur mécanisme d'action. Sans nous étendre sur leurs applications chimiques nous citerons leur emploi dans les oedèmes des cirrhoses hépatiques, les oedèmes des syndromes néphrotiques, les oedèmes cardiaques, idiopathiques, néoplasiques, gravidiques. A ces indications principales s'en ajoutent d'autres moins courantes, comme l'hypertension artérielle avec hypokaliémie, les insuffisances cardiaques avec troubles de l'excitabilité myocardique, la myasthénie. On trouvera dans des revues d'ensemble publiées ces dernières années, les détails pharmacologiques et chimiques (46) (89) (102).

Nous avons évoqué plus haut les recherches récentes sur la synthèse de composés médicamenteux dans lesquels le cycle butanolide comporte un atome d'azote. Il prend alors le nom d'oxazolone ou oxazolidone. Certains auteurs, utilisant une terminologie différente, désignent ces composés sous le nom d'azaspiroalcanones. De telles structures engendrent des activités au niveau du système nerveux central et périphérique. Le Fenspiride (* * *)est un antidyspnéique inhibant le bronchospasme à l'histamine, à la sérotonine, à l'acétylcholine.



Il est également antitussif et anti-inflammatoire. On trouve dans des brevets récents, la description d'oxadiaza (1, 3, 8) spiro (4, 5) décanes (35) à propriétés neuroleptiques ; on relève également des dioxodiazaspirodécanes associés au cycle de la phénothiazine (38) brevetés pour leurs propriétés adrénolytiques, et leurs effets hypotenseurs, sédatifs et neuroleptiques.

(*) Aldactone N. D. Byla
(* *) Phanurane N. D. Specia
(* * *) Viarespan N. D. Servier

RECHERCHES PERSONNELLES

De notre étude bibliographique nous avons retenu que les spirolactones de structure non stéroidique avaient été relativement peu étudiées en pharmacologie et moins encore en enzymologie.

Un vaste domaine reste donc à explorer. Par ailleurs, nous avons noté l'existence de méthodes permettant d'accéder sans trop de difficultés à des acides spirolactones carboxyliques. Cette possibilité d'introduire une fonction acide sur les molécules envisagées nous a séduit, en raison des perspectives qu'elle nous offrait d'obtenir des produits hydrosolubles se prêtant facilement à des études enzymologiques in vitro.

Nous avons donc, dans un premier temps, réalisé la synthèse de quelques composés comportant, les uns, un cycle butanolide ou acides paraconiques, les autres un cycle buténolide ou acides aconiques. Nous avons ensuite procédé à certaines études enzymologiques et pharmacodynamiques.

I - C H I M I E

CHAPITRE I

MATIERES PREMIERES

Nous avons utilisé comme matières premières plusieurs cétones cycliques et deux diesters.

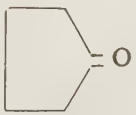
Nous avons déterminé les points de fusion au bloc Maquenne électrique et les indices à l'aide d'un réfractomètre O. P. L.

A - CETONES CYCLIQUES.

Elles peuvent être subdivisées en quatre groupes :

- Cyclanones aliphatiques.

- Cyclopentanone (Fluka AG Buchs S. G.).



C_5H_8O M = 84

Liquide huileux incolore, odorant.

Eb. = 128° C ; litt. : 130° C (103)

d_4^{20} = 0, 947 ; litt. : 0, 948

n_D^{20} = 1, 437 ; litt. : 1, 4366

Cyclohexanone (Synthèse et Recherches)

$C_6H_{10}O$ M = 98

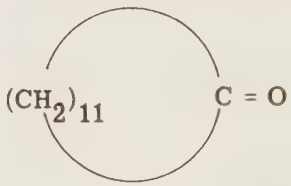
Liquide huileux incolore, odorant.

Eb. = 156° C ; litt. : 155° C (103)

d_4^{20} = 0,947 ; litt. : 0,9478

n_D^{20} = 1,4495 ; litt. : 1,4507

- Cyclododécanone (Synthèse et Recherches)

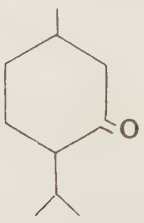


$C_{12}H_{22}O$ M = 182

Cristaux blancs à odeur camphrée.

F = 61° C ; litt. : 59° C (103)

- Isopropyl-2 méthyl-5 cyclohexanone : Menthone.
(Fluka AG Buchs S. G.)



$C_{10}H_{18}O$ M = 154

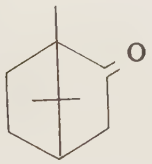
Liquide huileux incolore à odeur de menthe.

Eb. = 203° C ; litt. : 207° C (103)

d_4^{20} = 0,889 ; litt. : 0,8954

n_D^{20} = 1,450 ; litt. : 1,4505

- Camphre (Prolabo).



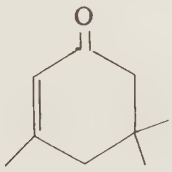
$C_{10}H_{16}O$ M = 152

Cristaux blancs d'odeur caractéristique.

F = 175° C ; litt. : 178° C (103)

- Cyclénones aliphatiques.

- Triméthyl-3, 5, 5 cyclohexène-2 one-1 : isophorone.
(Fluka AG Buchs S. G.)



$C_9H_{14}O$ M = 138

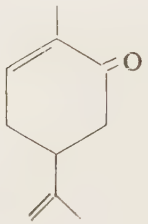
Liquide huileux incolore, odorant.

Eb. = 212° C ; litt. : 214° C (103).

d_4^{20} = 0,92 ; litt. : 0,9255

n_D^{20} = 1,477 ; litt. : 1,4766

- Isopropenyl-5 méthyl-2 cyclohexène-2 one-1 :
(+) Carvone (Fluka AG Buchs S.G.).



$C_{10}H_{14}O$ M = 150

Liquide huileux incolore, odorant.

Eb. = 227° C ; litt. : 230° C (103)

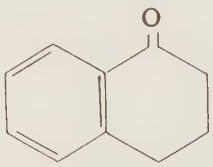
d_4^{20} = 0,965 ; litt. : 0,9608

n_D^{20} = 1,498 ; litt. : 1,4999

$(\alpha)_D^{20}$ = + 56° ; litt. : + 69,1° (61,7)

- Cyclanones aromatiques.

- Dihydro-3,4 2 H-naphtalénone-1 αTétralone.
(Fluka AG Buchs SG)



$C_{10}H_{10}O$ M = 146

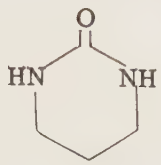
Liquide huileux, jaunâtre, odorant.

d_4^{20} = 1,094 ; litt. : $d_4^{15,6}$ = 1,0988 (103)

n_D^{20} = 1,568 ; litt. : n_D^{15} = 1,571

- Azacyclanones.

- Tétrahydropyrimidone-2 (Aldrich Chemical C° inc.)

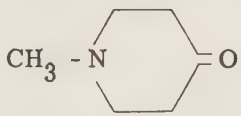


$C_4H_8N_2O$ M = 100

Cristaux blancs inodores.

F = 263 - 265° C

- Méthyl-1 piperidone-4 (Fluka AG Buchs SG)



$C_6H_{11}NO$ M = 113

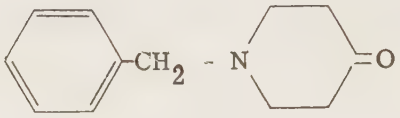
Liquide huileux, odorant, incolore.

Eb. = 55-60° C ; litt. : 56-58° C (103)

d_4^{20} = 0,97 ; litt. : d_{15}^{25} : 0,7525

n_D^{20} (après distillation) = 1,458 ; litt. : 1,4580

- Benzyl-1 piperidone-4 (Labolac).



$C_{12}H_{15}NO$ M = 189

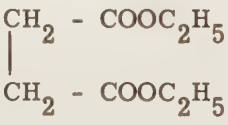
Liquide huileux, incolore, odorant.

$d_4^{20} = 1,064$; $d_3^{23} = 1,0626$ (103)

$n_D^{25} = 1,5382$; litt. : $n_D^{23} = 1,5374$

B - DIESTERS.

- Succinate de diéthyle (Fluka AG Buchs SG).



$C_{18}H_{14}O_4$ M = 174

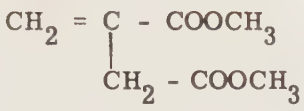
Liquide huileux, incolore, odorant.

Eb. = 215° C ; litt. : 217, 7° C (103)

$d_4^{20} = 1,04$; litt. : 1, 0402

$n_D^{20} = 1,420$; litt. : 1, 42007

- Itaconate de méthyle : méthylène succinate de diméthyle (Fluka AG Buchs SG).



$C_7H_{10}O_4$ M = 158

Cristaux blancs brillants.

F = 37° C ; litt. : 36-38° C (103).

CHAPITRE II

REACTIONS ET MECANISMES REACTIONNELS

A - LA CONDENSATION DE STOBBE.

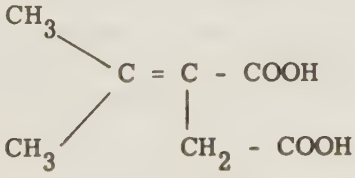
C'est en 1893 que STOBBE (209) condense l'acétone avec le succinate de diéthyle en présence d'éthylate de sodium.

Les conditions expérimentales sont celles de la réaction de CLAISEN qui permet de préparer les esters cétoniques par réaction entre un ester et un composé comportant un groupement méthylène actif. On pouvait donc s'attendre à la réaction suivante :

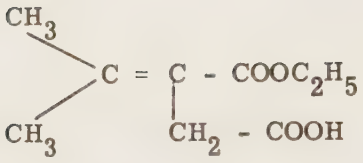
$$CH_3 - \underset{\underset{O}{\|}}{C} - CH_3 + H_5C_2O - \underset{\underset{O}{\|}}{C} - CH_2 - CH_2 - \underset{\underset{O}{\|}}{C} - OC_2H_5$$

$$\xrightarrow{Eto^-} CH_3 - \underset{\underset{O}{\|}}{C} - CH_2 - CO - CH_2 - CH_2 - \underset{\underset{O}{\|}}{C} - OC_2H_5 + C_2H_5OH$$

En fait, l'ester dicétonique ne se forme pas et STOBBE obtient l'acide diméthyl itaconique :



résultant de la condensation entre le groupement carbonyle de la cétone et le groupement méthylène α de l'ester. On admet que l'on passe par l'intermédiaire d'un hémiester :



Cette réaction a été réalisée par la suite en présence de différents esters succiniques substitués ou non, en utilisant des agents de condensation variés : éthylate et méthylate de sodium, hydrure de sodium éthylate de potassium. On peut utiliser comme composés carbonylés non seulement des cétones mais également différents aldéhydes. Une revue détaillée de la réaction de STOBBE a été publiée par Mlle D. BILLET (24) et une étude générale des composés préparés par cette méthode a été faite par JOHNSON (109) Nous avons utilisé la technique décrite par ce même auteur (110), qui prépare le carboxy-3 cyclohexanespiro-4 butanolide-4 à partir de la cyclohexanone.

La cyclanone est condensée avec un excès de succinate de diéthyle au sein de l'alcool tert-butylique anhydre en présence de tert-butylate de potassium et à ébullition à reflux sous azote.

L'hémiester est isolé sous forme d'une huile visqueuse incolore. La lactonisation est réalisée par chauffage au bain-marie dans l'acide chlorhydrique concentré : la solution brunâtre obtenue laisse précipiter par refroidissement le carboxy-3 cycloalcanespiro-4 butanolide-4. Dans le cas de la cyclododécanone, l'hémiester n'a pu être cyclisé que dans l'acide sulfurique concentré, en maintenant la température au voisinage de 0° C.

On obtient dans ce cas un éthoxy-carbonyl-3 butanolide-4.

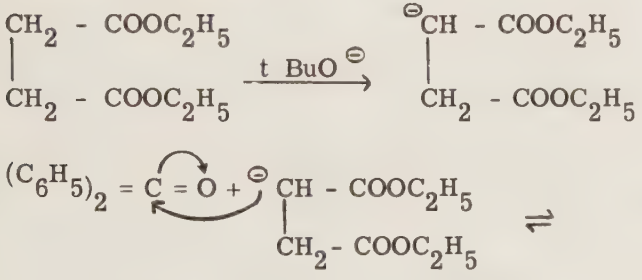
La cyclohexanone se condense avec d'excellents rendements. L'opération devient plus difficile quand la dimension du cycle diminue et que la tension augmente. Elle est pratiquement impossible avec la cyclopropanone. Les cyclanones à nombre d'atomes de carbone élevé réagissent facilement.

Mécanisme réactionnel.

JOHNSON (109) a décrit le mécanisme réactionnel dans le cas de la benzophénone. La réaction se déroulerait en deux étapes :

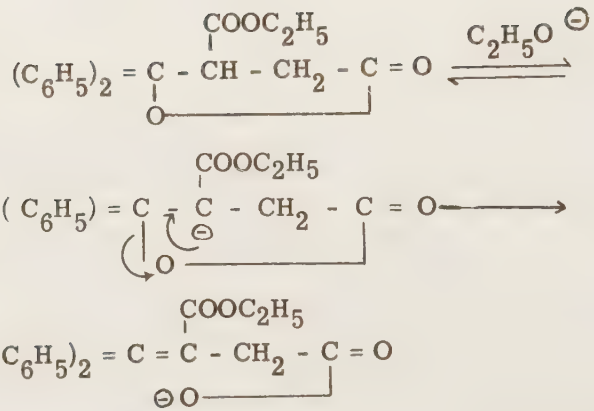
La première étape consiste en la formation du carbanion correspondant au succinate de diéthyle sous l'influence du tert-butylate de potassium.

Le composé carbonylé subit de la part de ce carbanion une attaque nucléophile en donnant un composé chargé qui se cyclise spontanément pour donner une lactone, par élimination d'éthanol :



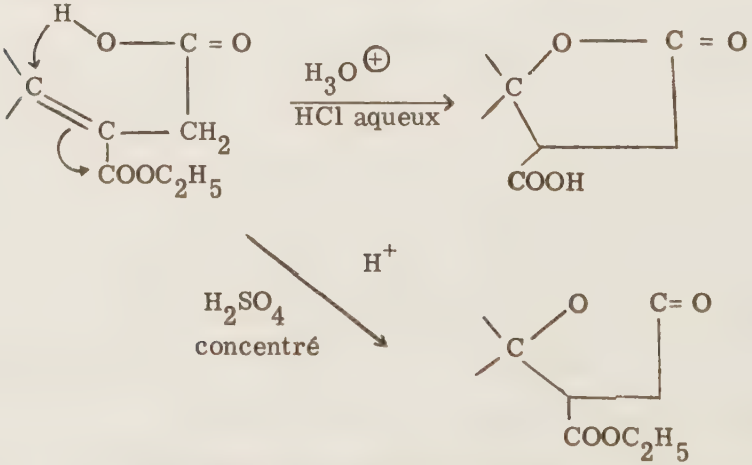
Cette lactone intermédiaire n'est pas isolée.

Au cours de la deuxième étape par prototropie on a ouverture de l'anneau lactonique et formation de l'hémiester selon le schéma suivant :



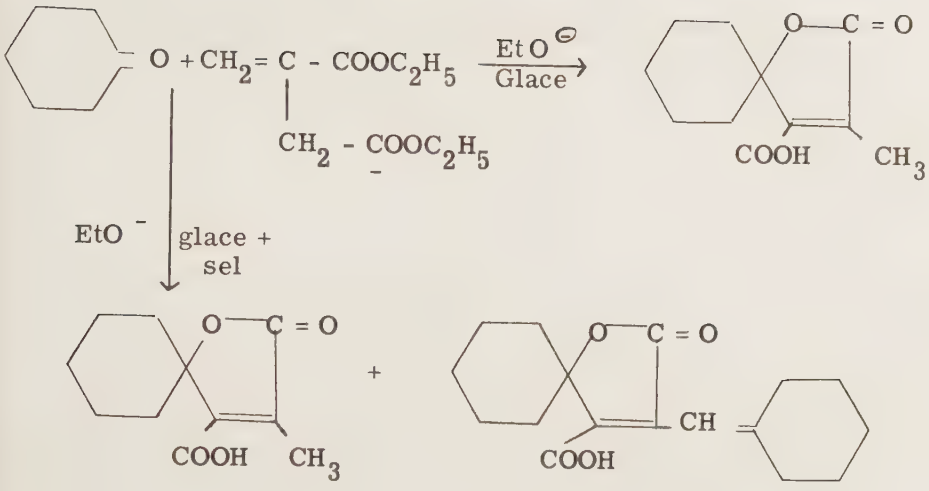
On peut supposer qu'en milieu acide l'hémiester se cyclise aux dépends de la double liaison, en conduisant à un acide lactone carboxylique saturé si l'on opère en présence d'acide chlorhydrique.

En milieu sulfurique concentré et à froid, on aboutit à l'ester lactonique correspondant, car l'hydrolyse ne peut se produire :



B - CONDENSATION DES CETONES AVEC UN DIESTER ITACONIQUE.

L'itaconate, plus réactif que le succinate, permet d'opérer à basse température et d'obtenir un buténolide acide en une seule étape. KATSUTA (115) condense l'itaconate de diéthyle avec diverses cétones, en particulier la cyclohexanone, dans l'éther anhydre en présence d'éthylate de sodium. Lorsqu'il opère dans un bain de glace, il obtient un buténolide acide, mais s'il réalise la condensation dans la saumure, il obtient un mélange de deux produits selon le schéma suivant :

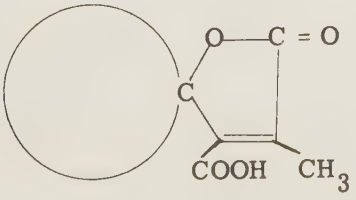


Il utilise une molécule d'ester pour deux molécules de cétone et deux molécules d'éthylate.

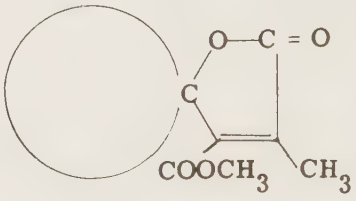
Nous nous sommes inspirés de cette technique en lui apportant quelques modifications.

Un mélange équimoléculaire de cyclanone et d'itaconate de méthyle est mis à réagir en présence de méthylate de sodium, au sein de l'éther anhydre et au bain de glace.

Après élimination du solvant, on passe en milieu aqueux. Lorsqu'on utilise deux molécules de méthylate pour une molécule de cyclanone, on a formation de carboxy-3 cycloalcanespiro-4 butène-2 olide-4 soluble sous forme de sel sodique.



Lorsqu'on utilise une molécule de méthylate, on obtient le méthoxycarbonyl-3 cycloalcanespiro-4 butène-2 olide-4, insoluble en milieu aqueux, que l'on isole par filtration.

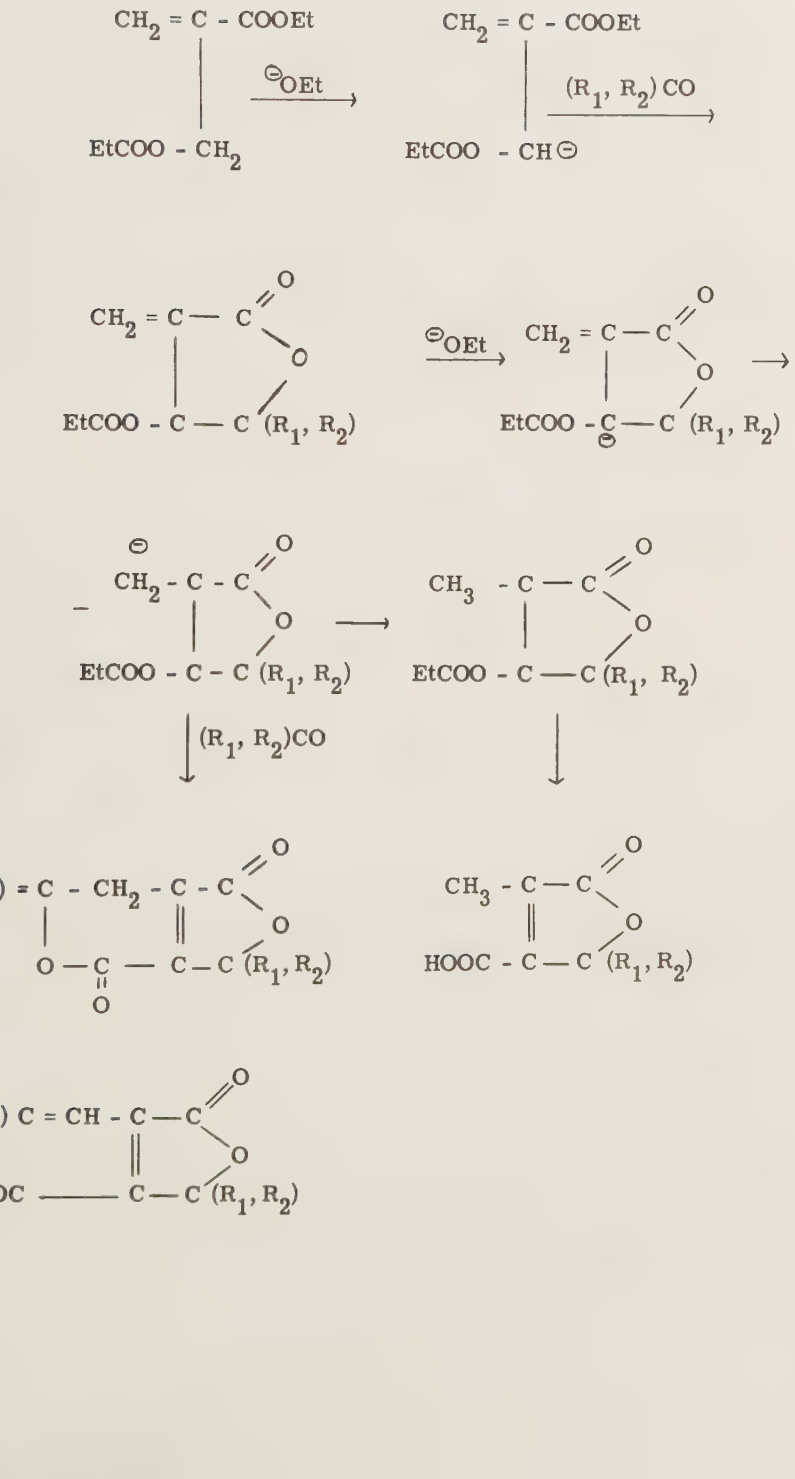


Les composés sont recristallisés dans un mélange eau-alcool.

Les cyclanones azotées donnent naissance à un composé amphotère qui prend ici la forme d'un chlorhydrate soluble. Il est isolé par évaporation de la couche aqueuse et repris par l'éthanol. Notons que KATSUTA ne prépare pas directement les méthoxycarbonyl-3 buténolides, mais les obtient en traitant les carboxy-3 buténolides correspondants par le diazométhane.

Mécanisme réactionnel.

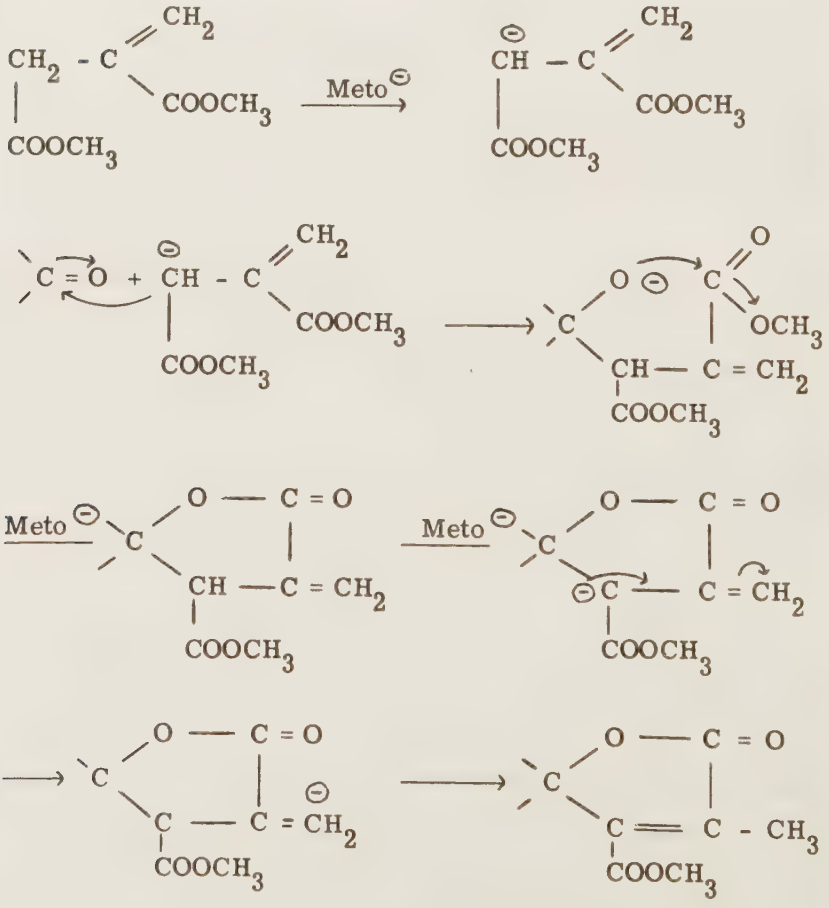
KATSUKA pour expliquer la formation des deux dérivés obtenus par condensation propose le schéma suivant



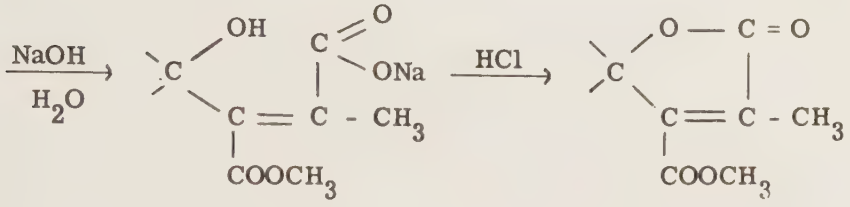
La formation de l'heptène dilactone avait déjà été rapportée par FITTIG (74) (75).

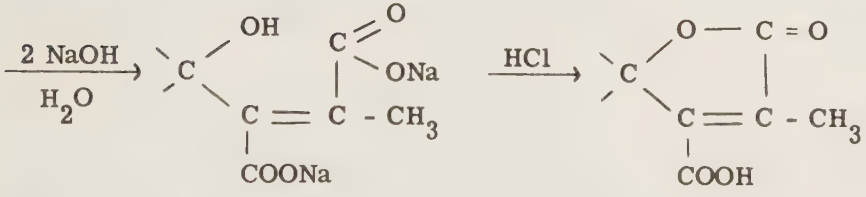
On peut détailler le mécanisme de la réaction que nous avons utilisée en le divisant en deux étapes :

Dans un premier temps, en présence de méthylate de sodium, on a formation du carbanion correspondant à l'itaconate de méthyle. La cétone cyclique subit une attaque nucléophile de la part de ce carbanion. On a formation d'un intermédiaire chargé, qui se cyclise par élimination de méthanol en donnant un butanolide. Ce dernier, par prototropie conduit à un buténolide :



Dans un deuxième temps, le passage en milieu aqueux libère à partir du méthylate une ou deux molécules de soude, ce qui a pour effet d'ouvrir le cycle lactonique. Dans le premier cas la fonction ester est conservée ; dans le deuxième cas il se forme un sel disodique. En présence d'acide chlorhydrique le cycle lactonique se referme selon le schéma suivant :

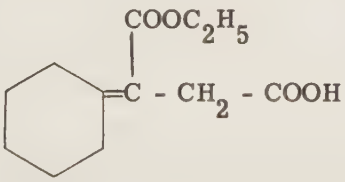




CHAPITRE III

PRODUITS PREPARES ET MODE OPERATOIRE

Ethoxycarbonyl-3 cyclohexylidène-3 propanoïque (I)



$C_{12}H_{18}O_4$ M = 226

Nous utilisons la méthode décrite par JOHNSON (110).

A une solution de 4,3 g (0,11 mole) de potassium dans 90 cm3 de tert-butanol anhydre, on ajoute 9,8 g (0,1 mole) de cyclohexanone et 26,1 g (0,15 mole) de succinate de diéthyle. Après chauffage à reflux sous azote pendant trente minutes et refroidissement dans un bain de glace on acidifie par 40 cm3 d'acide chlorhydrique à 50 p. 100. L'alcool est éliminé sous vide et le résidu extrait à l'éther. La solution éthérée est traitée plusieurs fois par une solution saturée de bicarbonate de sodium. L'acidification de cette solution par l'acide chlorhydrique dilué libère l'hémiester sous forme d'une huile brûnâtre . Cette huile est reprise à l'éther

et l'extrait éthéré est lavé plusieurs fois avec une solution saturée de chlorure de sodium, puis séché sur sulfate de sodium anhydre. Par évaporation de l'éther on obtient 18,1 g d'hémiester, sous forme d'une huile visqueuse jaune pâle.

- Point d''ébullition : 152° C (0,5 mm)
- Rendement : 80 %

On peut procéder alors à une distillation, qui permet d'obtenir une huile incolore.

- Point d'ébullition : 160° C (0,6 mm) ; litt. : 154-156° C

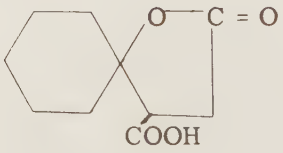
- n_D^{23} = 1,481 ; litt. : n_D^{25} = 1,483.

-Analyse. (★)

Eléments	Calculé %	Trouvé %
C	63,71	63,38
H	7,96	7,82

(★) Ces déterminations ont été effectuées soit par le service central de microanalyse du C. N. R. S., soit par la Société FERLUX.

Carboxy-3 cyclohexanespiro-4 butanolide-4 (II)



$C_{10}H_{14}O_4$ M = 198

On chauffe au bain-marie 30 minutes, 18 g d'hémiester en suspension dans 180cm3 d'acide chlorhydrique concentré.

La solution brunâtre obtenue est abandonnée à la température du Laboratoire. Par refroidissement, l'acide lactone carboxylique précipite.

On obtient 14,5 g de cristaux blancs isolés par filtration.

- Rendement : 92,3 %
- Rendement à partir de la cyclohexanone : 73,2 %

Le produit est recristallisé dans un mélange eau-alcool (3 : 1).

F = 188° C ; litt. : 186-187° C

- Analyse.

Eléments	Calculé %	Trouvé %
C	60,60	60,37
H	7,07	6,86

N. B. -

Les conditions expérimentales relativement sévères de cette réaction, nous ont conduit à tenter de la réaliser à basse température, afin de pouvoir éventuellement, par la suite, l'appliquer à des composés plus fragiles, tels les cétones terpéniques et hétérocycliques.

Préparation à froid.

On met dans un bain de glace une solution de 4,3 g de potassium (0,11 mole) dans 90 cm3 de tert-butanol anhydre. On ajoute 9,8 g (0,1 mole)de cyclohexanone et 26,1 g (0,15 mole) de succinate de diéthyle. On agite 2 heures à 0° C puis on abandonne 12 heures à température ambiante.

Après dilution par 90 cm3 d'eau on chasse le tert-butanol sous vide et on extrait le résidu à l'éther. A partir de la solution éthérée, on extrait l'hémiester par une solution saturée de bicarbonate de sodium. L'acidification de cette solution par HCl à 50 p. 100 provoque la précipitation

d'une huile qui est extraite à l'éther. La solution éthérée est lavée plusieurs fois par une solution saturée de chlorure de sodium, puis séchée sur sulfate de sodium anhydre. Par évaporation de l'éther, on obtient 21,4 g d'une huile jaune pâle.

Cette huile a un $n_D^{24} = 1,464$ intermédiaire entre celui de l'hémiester ($n_D^{23} = 1,481$) et celui du succinate de diéthyle ($n_D^{22} = 1,420$).

L'huile est abandonnée à l'air et il se forme des cristaux incolores. Par filtration on isole 14,8 g de produit.

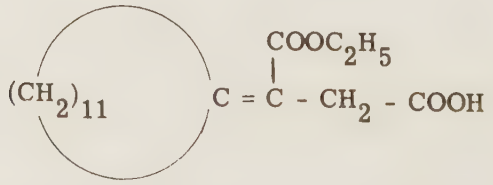
- Rendement : 65,8 %
- F : 75° C

La microanalyse et le spectre infra-rouge permettent de confirmer qu'il s'agit de l'hémiester.

- Analyse.

Eléments	Calculé %	Trouvé %
C	63,71	63,59
H	7,96	7,92

Ethoxycarbonyl-3 cyclododécylidène-3 propanoïque (III)



$C_{18}H_{30}O_4$ M = 310

A une solution de 2,15 g (0,055 mole) de potassium dans 90 cm3 de tert-butanol anhydre, on ajoute 9,1 g (0,05 mole) de cyclododécanone et 13 g (0,075 mole) de succinate de diéthyle. On chauffe à reflux 15 minutes sous azote et l'on acidifie, après refroidissement, par de l'acide chlorhydrique à 50 p. 100.

On évapore sous vide la plus grande partie de l'alcool et l'on extrait à l'éther.

A partir de la solution éthérée, l'hémiester est extrait sous forme de sel sodique par une solution saturée de bicarbonate de sodium. La solution aqueuse est alors acidifiée par l'acide chlorhydrique dilué. L'hémiester apparaît sous forme d'une huile brunâtre que l'on dissout dans l'éther. Après plusieurs lavages par une solution saturée de chlorure de sodium, l'extrait éthéré est séché sur sulfate de sodium anhydre. Par évaporation de l'éther on obtient 13,4 g d'huile orangée.

- Point d'ébullition : 165° C sous 0,6 mm
- Rendement : 86,4 %

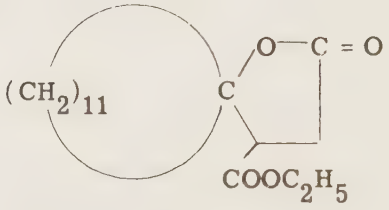
La distillation sous vide permet d'obtenir une huile pratiquement incolore.

- Point d'ébullition : 162° C sous 0,5 mm
- $n_D^{20} = 1,482$

- Analyse.

Eléments	Calculé %	Trouvé %
C	69,67	69,42
H	9,67	9,58

Ethoxycarbonyl-3 cyclododécanespiro-4 butanolide-4 (IV)



$C_{18}H_{30}O_4$ M = 310

On dissout les 13,4 g d'hémiester obtenus à partir de la cyclododécanone dans 27 cm3 d'acide sulfurique concentré. On opère à 0° C dans un bain de glace. Après quinze minutes, la solution sulfurique brunâtre est versée sur de la glace. Il apparaît un précipité gommeux qui est extrait à l'éther. Après séchage de l'éther sur sulfate de sodium anhydre et évaporation, on obtient 12,2 g d'un solide jaune pâle.

- Rendement : 91 %
- Rendement à partir de la cyclododécanone : 79,3 %

La recristallisation dans un mélange eau-alcool (3 : 1) permet l'obtention du produit sous forme de microcristaux blancs.

- F = 94° C.

- Analyse.

Eléments	Calculé %	Trouvé %
C	69,67	69,20
H	9,67	9,38

- Remarques.

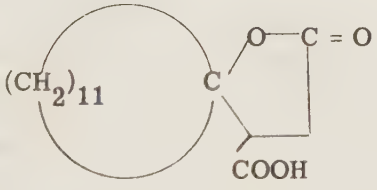
Si l'on traite l'hémiester par l'acide chlorhydrique concentré à chaud, il ne se dissout pas et la lactonisation ne se fait pas.

Nous avons également essayé de cycliser l'hémiester par l'acide chlorhydrique en milieu alcoolique. Dans ce cas il passe en solution.

Par évaporation de la solution alcoolique, on obtient une huile orangée qui ne présente plus en infra-rouge la bande d'absorption caractéristique de la fonction acide carboxylique. Par contre, la bande ester est plus importante que dans le produit de départ. Il s'agit probablement d'un diester: le cyclododécylidène succinate de diéthyle. L'utilisation de l'alcool en milieu acide est d'ailleurs un procédé classique d'estérification.

L'acide acétique en présence d'acide chlorhydrique et l'anhydride acétique se sont également révélés impropres pour la cyclisation de l'hémiester en butanolide.

Carboxy-3 cyclododécanespiro-4 butanolide-4 (V).



$C_{16}H_{26}O_4$ M = 282

A 120 cm3 d'une solution aqueuse de soude à 3 p. 100 (0,09 mole) on ajoute 7,55 g (0,025 mole) de la lactone ester obtenue à partir de la cyclododécanone.

Le mélange est agité cinq heures à température ambiante. L'ester est alors complètement saponifié et passe en solution. Le mélange est abandonné jusqu'à ce que le produit non hydrolysé se sépare sous forme d'une pellicule huileuse.

La couche aqueuse est alors séparée, lavée plusieurs fois à l'éther et acidifiée par l'acide chlorhydrique à 50 p. 100.

L'acide lactone carboxylique précipite.

Il est repris à l'éther puis extrait par une solution saturée de bicarbonate de sodium. Par acidification de cette solution, on a précipitation de 6 g de cristaux blancs que l'on isole par filtration.

- Rendement : 85 %
  La recristallisation est effectuée dans un mélange eau-alcool (3 : 1).
- F : 144° C

- Analyse.

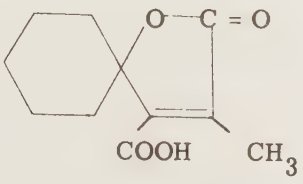
Eléments	Calculé %	Trouvé %
C	68,08	67,95
H	9,25	9,18

N.B. -

Nous avons essayé de condenser la cyclododécanone avec l'itaconate de méthyle en présence de méthylate, au sein d'éther anhydre. La condensation ne se fait pas. Dans le cadre de ce travail, nous n'avons pu pousser plus avant nos investigations.

Notons que NOZAKI (155) utilise le carboxy-3 cyclododécanespiro-4 butanolide-4 pour préparer des bicyclopentadécanes.

Méthyl-2 carboxy-3 cyclohexanespiro-4 butène-2 olide-4 (VI).



$C_{11}H_{14}O_4$ M = 210

Nous utilisons la méthode décrite par KATSUTA (115).

A 10,8 g (0,2 mole) de méthylate de sodium en suspension dans 150 cm3 d'éther anhydre, on ajoute goutte à goutte, en agitant, une solution éthérée renfermant 9,8 g (0,1 mole) de cyclohexanone et 15,8 g (0,1 mole) d'itaconate de méthyle. On opère à 0° dans un bain de glace. La solution éthérée devient orangée en une heure environ. Après 3 heures d'agitation, l'éther est évaporé sous vide et le résidu dissous dans 100 cm3 d'eau. La solution aqueuse est lavée plusieurs fois à l'éther, puis acidifiée par l'acide chlorhydrique à 50 p. 100. L'acide lactone carboxylique précipite. Il est repris à l'éther, puis extrait par une solution saturée de bicarbonate de sodium. Par acidification de cette solution on obtient 18,6 g d'un solide blanc que l'on isole par filtration.

- Rendement : 88,6 %

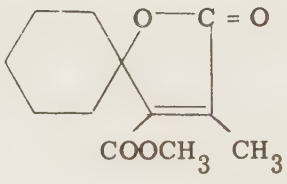
La recristallisation dans un mélange eau-alcool (1 : 1) donne des microcristaux blancs.

- F : 273° C (décomp.) ; litt. : 276° C.

- Analyse.

Eléments	Calculé %	Trouvé %
C	62,85	63,09
H	6,66	6,80

Méthyl-2 méthoxycarbonyl-3 cyclohexanespiro-4 butène-2 olide-4 (VII)



$C_{12}H_{16}O_4$ M = 224

A 5,4 g (0,1 mole) de méthylate de sodium en suspension dans l'éther anhydre, on ajoute goutte à goutte en agitant, une solution éthérée renfermant 9,8 g (0,1 mole) de cyclohexanone et 15,8 g (0,1 mole) d'itaconate de méthyle. On opère à 0° C dans un bain de glace. Après 3 heures d'agitation l'éther est évaporé sous vide. Le résidu est repris à l'eau acidifiée par l'acide chlorhydrique.

L'ester insoluble est isolé par filtration.

On recueille 19,9 g de cristaux blancs.

- Rendement : 89 %

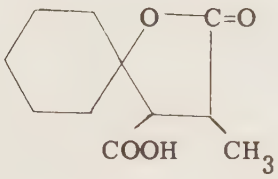
La recristallisation est effectuée dans un mélange eau-alcool (1 : 1).

- F : 94° C (litt. : 93-94° C)

- Analyse.

Eléments	Calculé %	Trouvé %
C	64,30	64,29
H	7,14	7,18

Méthyl-2 carboxy-3 cyclohexanespiro-4 butanolide-4 (VIII)



$C_{11}H_{16}O_4$ M = 212

Nous avons utilisé la méthode décrite par KATSUTA (115) pour l'acide triméthyl paraconique.

On dissout dans 100 cm3 d'eau 10,5 g (0,05 mole) de buténolide, par neutralisation avec une solution de soude à 10 p. 100.

On ajoute 33 g d'amalgame de sodium à 8 p. 100 et l'on agite 8 heures à température ambiante. La solution aqueuse est acidifiée par l'acide chlorhydrique à 50 p. 100 Le butanolide acide précipite. Il est repris à l'éther, puis extrait plusieurs fois par une solution saturée de bicarbonate. Par acidification avec de l'acide chlorhydrique au demi, on obtient 8,84 g d'un solide blanc.

- Rendement : 84 %

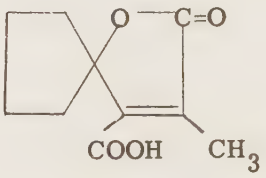
La recristallisation effectuée dans un mélange eau-alcool (1 · 1) donne des microcristaux brillants incolores.

- F : 198° C (litt. : 196-197° C)

- Analyse.

Eléments	Calculé %	Trouvé %
C	62,26	62,50
H	7,55	7,68

Méthyl-2 carboxy-3 cyclopentanespiro-4 butène-2 olide-4 (IX)



$C_{10}H_{12}O_4$ M = 196

A 10,8 g (0,2 mole) de méthylate de sodium en suspension dans 150 cm3 d'éther anhydre, on ajoute goutte à goutte, en agitant, une solution éthérée renfermant 8,4 g (0,1 mole) de cyclopentanone et 15,8 g (0,1 mole) d'itaconate de méthyle. On opère dans un bain de glace à 0° C. Au bout de 3 heures, l'éther est évaporé sous vide. On ajoute alors 100 cm3 d'eau pour dissoudre le résidu. On obtient une solution trouble, qui devient limpide après lavage à l'éther.

L'acidification de la solution aqueuse par l'acide chlorhydrique à 50 p. 100 provoque la précipitation d'une bouillie jaunâtre.

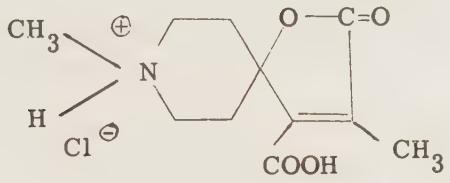
Ce précipité est repris à l'éther, puis extrait par une solution saturée de bicarbonate. Par acidification de cette solution, on obtient un précipité huileux jaune pâle que l'on ne peut isoler par filtration. On procède immédiatement à la recristallisation dans un mélange eau-alcool (1 : 1). On obtient alors 6,25 g de produit sous forme de fines paillettes incolores.

- Rendement : 32 % (recristallisé)
- F : 196° C.

- Analyse.

Eléments	Calculé %	Trouvé %
C	61,22	61,24
H	6,12	6,10

Chlorure de méthyl-2 carboxy-3 (N-méthyl piperidinium-4' spiro)4 butène-2 olide-4 (X).



$C_{11}H_{16}O_4NCl$ M : 261,5

On met en suspension dans de l'éther anhydre 10,8 g (0,2 mole) de méthylate de sodium. On ajoute goutte à goutte en agitant, une solution éthérée renfermant 11,3 g (0,1 mole) de N méthyl pipéridone et 15,8 g (0,1 mole) d'itaconate de méthyle.

On opère au bain de glace à 0° C. Après 3 heures d'agitation, l'éther est évaporé sous vide et le résidu repris par l'eau. La solution aqueuse, après plusieurs lavages à l'éther, est acidifiée par l'acide chlorhydrique. Le buténolide acide reste en solution sous forme de chlorhydrate. L'eau est évaporée sous vide à 55° C et l'on obtient un résidu jaune pâle renfermant l'acide lactone carboxylique et du chlorure de sodium. A partir de ce résidu on extrait la lactone par 200 cm3 d'alcool absolu et on filtre pour éliminer le sel minéral. La solution alcoolique est alors concentrée sous vide à 45° C jusqu'à saturation. Par refroidissement précipitent 14,2 g de produit sous forme de cristaux blancs, que l'on isole par filtration.

- Rendement : 54,2 %

Le caractère amphotère du composé obtenu nous a posé de nombreux problèmes de recristallisation. Le produit soluble dans l'eau, forme d'autre part une pâte visqueuse en présence de solvants organiques apolaires. Nous l'avons recristallisé par dissolution à chaud dans le minimum d'alcool absolu. On obtient alors des cristaux hygroscopiques pratiquement incolores.

F : 278° C.

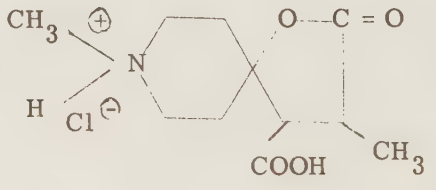
- Analyse .

Eléments	Calculé %	Trouvé %
C	50, 48	50, 24
H	6, 12	6, 14
N	5, 31	5, 17
Cl	13, 57	13, 29

- Remarques.

L'évaporation à sec de la solution alcoolique permet d'obtenir de meilleurs rendements en produit brut. Le composé se présente alors sous forme d'une masse friable jaune pâle, mais il est pratiquemment impossible de le recristalliser, car il devient pâteux dès qu'il est mis au contact de l'air.

Chlorure de méthyl-2 carboxy-3 (N méthyl piperidinium - 4' spiro) 4 butanolide - 4 (XI)



$C_{11}H_{18}O_4NCl$ M = 263, 5

On dissout dans 100cm^3 d'eau 13, 15g (0,05 mole) de buténolide acide. On ajoute 33 g. d'amalgame de sodium à 8 p. 100 et on agite 8 heures à température ambiante. On acidifie la solution aqueuse par l'acide chlorhydrique à 50 p. 100 et on évapore sous vide à 55° C. Le résidu est repris par l'alcool absolu qui dissout le butanolide et on filtre pour éliminer le chlorure de sodium formé. Par

concentration sous vide de la solution alcoolique à 45° C et refroidissement, on obtient 9, 5g de cristaux blancs hygroscopiques.

- Rendement : 72 %

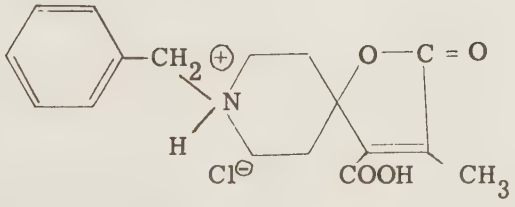
La recristallisation effectuée dans le minimum d'alcool absolu donne de fines paillettes blanches.

- F : 245° C.

- Analyse.

Eléments	Calculé %	Trouvé %
C	50, 1	49, 7
H	6, 83	6, 77
N	5, 31	5, 22
Cl	13, 47	13, 18

Chlorure de méthyl-2 carboxy-3 (N benzyl piperidinium-4' spiro)4 butène-2 olide-4 (XII)



$C_{17}H_{20}O_4NCl$ M = 337, 5

A 5, 9g (0, 1mole) de méthylate en suspension dans l'éther anhydre, on ajoute goutte à goutte, en agitant, une solution éthérée renfermant 9, 45g (0, 05 mole) de N benzyl pipéridone et 7, 9g (0, 05 mole) d'itaconate de méthyle. On opère au bain de glace à 0°C. Après 3 heures d'agitation l'éther est évaporé sous vide et le résidu repris par l'eau. La solution aqueuse, après plusieurs lavages à l'éther, est acidifiée par l'acide chlorhydrique à 50 p. 100 puis évaporée sous vide à 55°C. A partir du résidu le buténolide est dissous dans l'alcool absolu. On filtre ensuite pour éliminer le chlorure de sodium formé. La solution alcoolique est alors concentrée sous

vide à 45° C jusqu'à saturation. Par refroidissement on obtient 8,6g de produit brut sous forme de cristaux blancs.

- Rendement : 51%.

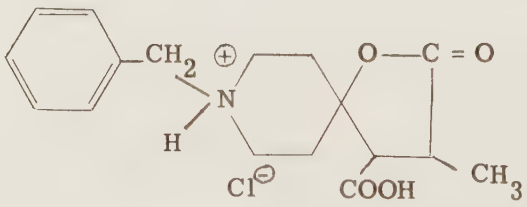
La recristallisation dans le minimum d'alcool absolu donne des microcristaux blancs brillants.

- F : 301°C.

- Analyse.

Eléments	Calculé %	Trouvé %
C	60,44	60,13
H	5,92	5,93
N	4,15	4,23
Cl	10,52	10,39

Chlorure de méthyl-2 carboxy-3 (N benzyl piperidinium-4' spiro) 4 butanolide-4 (XIII)



$C_{17}H_{22}O_4NCl$ M = 339,5

On dissout dans 100cm^3 d'eau 8,9g. (0,025 mole) de buténolide et l'on ajoute 16,5g. d'amalgame de sodium à 8 p. 100. Après huit heures d'agitation à température ambiante, on acidifie par l'acide chlorhydrique à 50 p. 100. La solution aqueuse est alors évaporée sous vide à 55° C. A partir du résidu on extrait le butanolide par l'alcool absolu et on filtre pour éliminer le chlorure de sodium. La solution alcoolique est concentrée sous vide à 45° C jusqu'à saturation. Par refroidissement précipitent 6,7g. d'un solide blanc hygroscopique.

- Rendement : 75%.

La recristallisation effectuée dans le minimum d'alcool absolu donne de fines paillettes incolores.

- F : 261° C.

- Analyse.

Eléments	Calculé%	Trouvé%
C	60, 09	60, 3
H	6, 48	6, 54
N	4, 12	4, 16
Cl	10, 45	10, 32

- ETUDES CONCERNANT LA PREPARATION D'AUTRES LACTONES DERIVEES DE CYCLANONES OU AZACYCLANONES -

Nous avons essayé de préparer d'autres acides spirolactone carboxyliques à partir de cétones cycliques déjà citées dans les matières premières : le camphre, la menthone, l'isophorone, la carvone, la tétralone et la tétrahydropyrimidone.

Nous avons fait réagir sur la plupart de ces cétones le succinate de diéthyle à chaud et à froid en présence de tert-butylate de potassium et l'itaconate de méthyle à froid en présence de méthylate de sodium. Ce dernier ester ne peut en effet être utilisé à chaud ou en présence d'une base plus forte sans éviter sa polymérisation. Nous n'avons jamais pu obtenir les lactones correspondant à ces différents composés.

Les échecs constatés en série terpénique semblent, en ce qui concerne le camphre et la menthone liés à une réactivité moins grande du carbonyle, peut-être en raison de l'encombrement stérique créé par la présence de substituants ou de cycles au voisinage de ce groupement.

Lorsque le carbonyle est conjugué avec une double liaison éthylénique, comme c'est le cas pour la carvone et l'isophorone, une autre possibilité est apportée à l'agent nucléophile qui peut se prêter à une réaction d'addition 1-4 de type MICHAEL.

Le carbonyle de la tétrahydropyrimidone a une réactivité très différente du carbonyle cétonique puisqu'il s'agit en fait d'un uréide. Enfin l'α tétralone semble constituer un cas limite.

Si nous n'avons pu obtenir l'acide spirolactone carboxylique correspondant par condensation avec l'itaconate de méthyl à froid, la condensation de STOBBE est possible avec le succinate de diéthyle à chaud, comme l'a montré JOHNSON (111).

CHAPITRE IV

ETUDE DES SPECTRES INFRA-ROUGES

Les spectres infra-rouges des différents lactones que nous avons préparées ont été réalisés sur un appareil BECKMAN IR 8, linéaire en nombre d'ondes, en utilisant deux techniques différentes.

La première partie des spectres, entre 4000 et 2000 cm-1, a été tracée après broyage de la substance et mise en suspension dans l'hexachlorobutadiène ; cette méthode permet d'éminier tout apport d'eau susceptible de perturber la région des vibrations de valence ν (OH) des acides lactone-carboxyliques.

La deuxième partie des spectres, de 2000 à 600cm-1 a été obtenue en utilisant la technique habituelle des pastilles au bromure de potassium.

Sur les spectres nous avons cherché les bandes principales correspondant aux divers groupes caractéristiques de nos molécules et nous avons essayé de donner une explication aux déplacements parfois observés par suite de conjugaisons ou d'associations de molécules. Pour nous aider dans cette interprétation, nous avons utilisé comme source de documentation les ouvrages de BELLAMY (19), NAKANISHI (150), RAO (174) et KENDALL (118).

A - ETUDE DE LA REGION DE 4000 A 2000 cm-1

1) Lactones préparées à partir des cyclanones (II, IV, V, VI, VII, VIII, IX).

Sur tous les spectres, on retrouve la présence de deux pics plus ou moins importants situés aux alentours de 2930 et 2850 cm-1. Ces pics correspondent respectivement aux vibrations de valence assymétriques et symétriques des groupements CH_2. Ils sont particulièrement marqués pour les dérivés de la cyclododécanone (n°IV et V).

Les acides lactone carboxyliques présentent en outre une absorption entre 3000 et 2500 cm-1, caractéristique des vibrations ν(OH) du groupement carboxyle.

Cette absorption disparaît dans les spectres des esters IV et VII.

Une autre bande située entre 3300 et 3500 cm-1 figure sur tous les spectres. Elle semble due à la présence d'eau dans la molécule. La microanalyse de ces produits, ainsi que la détermination de leur teneur en eau par la méthode de KARL-FISCHER, confirment cette constation.

2) Lactones préparées à partir des azacyclanones (n°X, XI, XII, XIII).

La structure de ces composés est confirmée par la présence d'une bande ammonium tertiaire ν (NH^+) située entre 2700 et 2250cm-1. Cette bande interfère plus ou moins avec les vibrations ν(OH) du groupement carboxyle.

Comme dans les spectres précédents, la présence d'un pic OH vers 3400cm-1 permet d'affirmer que ces composés sont également hydratés.

B - ETUDE DE LA REGION DE 2000 à 600 cm-1

Cette région est intéressante en raison de la présence de carbonyles dans ces molécules.

En ce qui concerne la vibration de valence ν(C=O) de la fonction lactone, l'examen des spectres nous permet de distinguer deux cas :

1) - la vibration du carbonyle lactonique se trouve à une fréquence anormalement basse, située aux environs de

1740 cm-1 pour les butanolides II, V et VIII et vers 1720 cm-1 pour les buténolides VI et IX.

Le glissement du pic lactone vers de fréquences plus basses semble lié à l'existence de puissantes associations intermoléculaires entre l'OH carboxylique et le carbonyle lactonique.

2) - la vibration du carbonyle lactonique se trouve à une fréquence normale.

C'est le cas des esters IV et VII, ainsi que des composés préparés à partir des azacyclanones (n°X, XI, XII, XIII).

Dans les spectres de ces substances, le pic lactonique se trouve aux environs de 1770 cm-1 pour les olides saturés et de 1750 cm-1 pour les olides insaturés.

Les associations précédentes ne peuvent effectivement plus se manifester lorsque le carboxyle est estérifié.

Le phénomène est plus difficile à expliquer dans le cas des substances contenant un azote chargé.

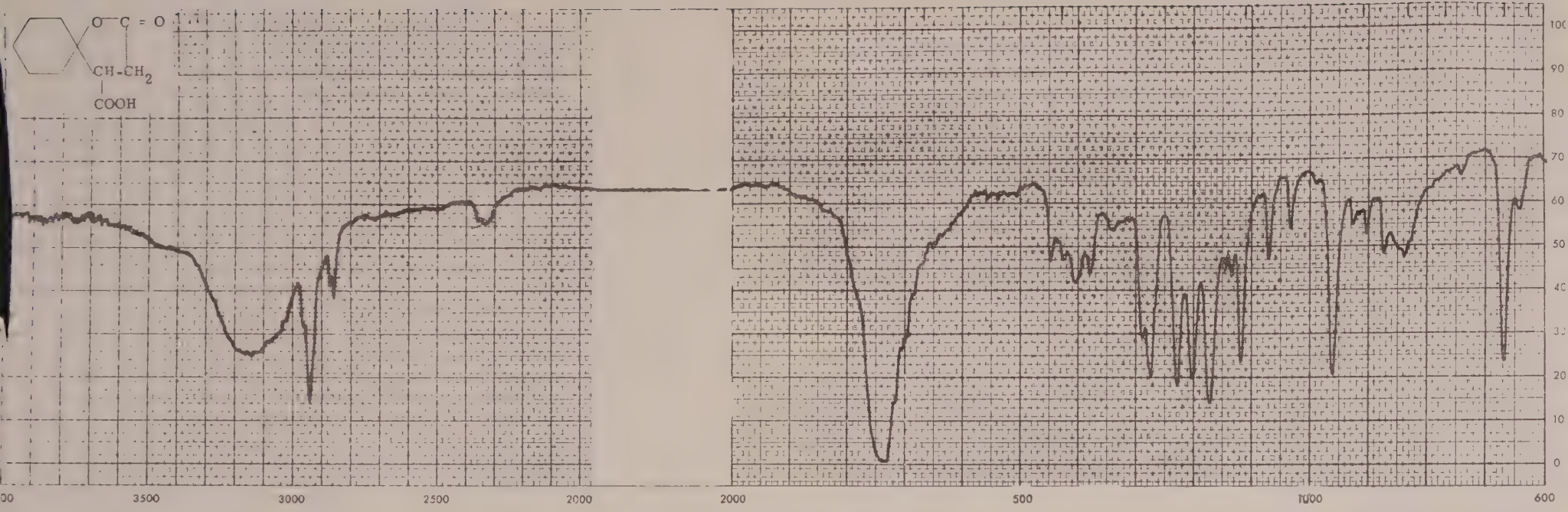
Une autre vibration intéressante dans cette région du spectre est celle du carbonyle carboxylique.

Dans le cas des olides saturés, cette vibration se situe aux environs de 1710 cm-1 et se manifeste tantôt sous forme d'un simple épaulement sur la bande lactone (composés II, V, VIII), tantôt sous forme d'un pic individualisé (composés XI, XII).

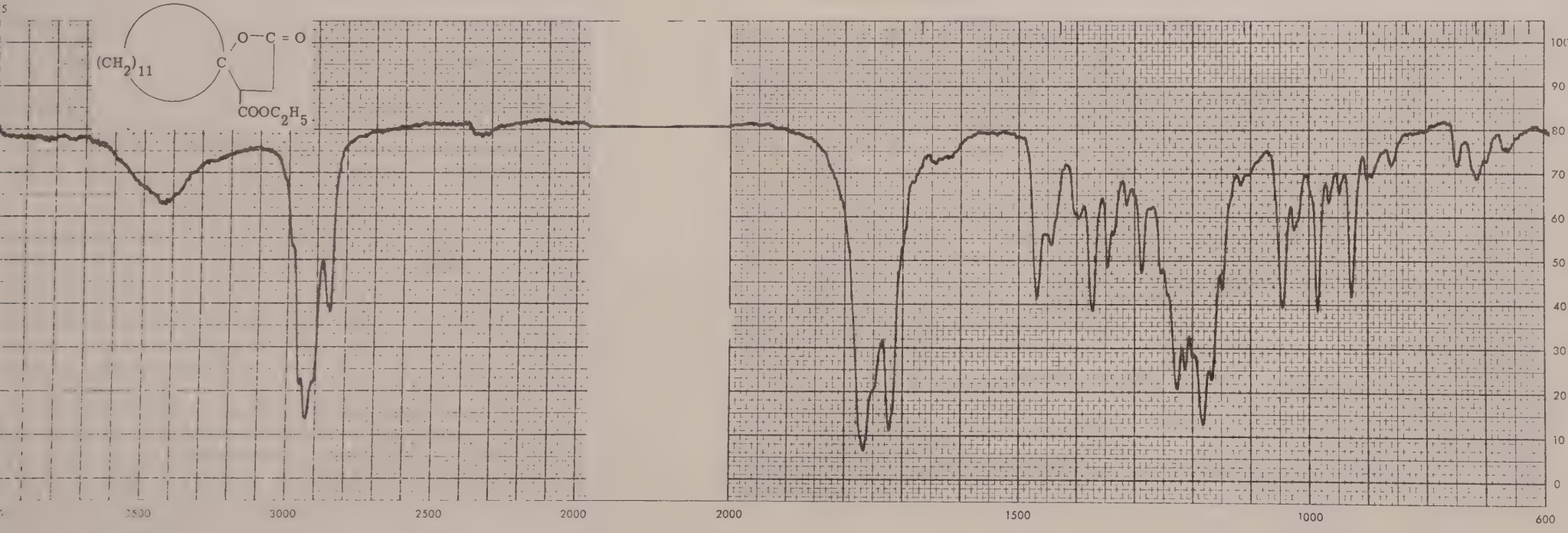
Dans les olides insaturés, elle se traduit par un pic situé à 1710 cm-1 (n°X et XII) ou à 1690 cm-1 (n°VI, et IX) selon que la molécule renferme ou non un groupement ammonium. De plus le pic situé à 1650 cm-1 confirme la présence de la double liaison.

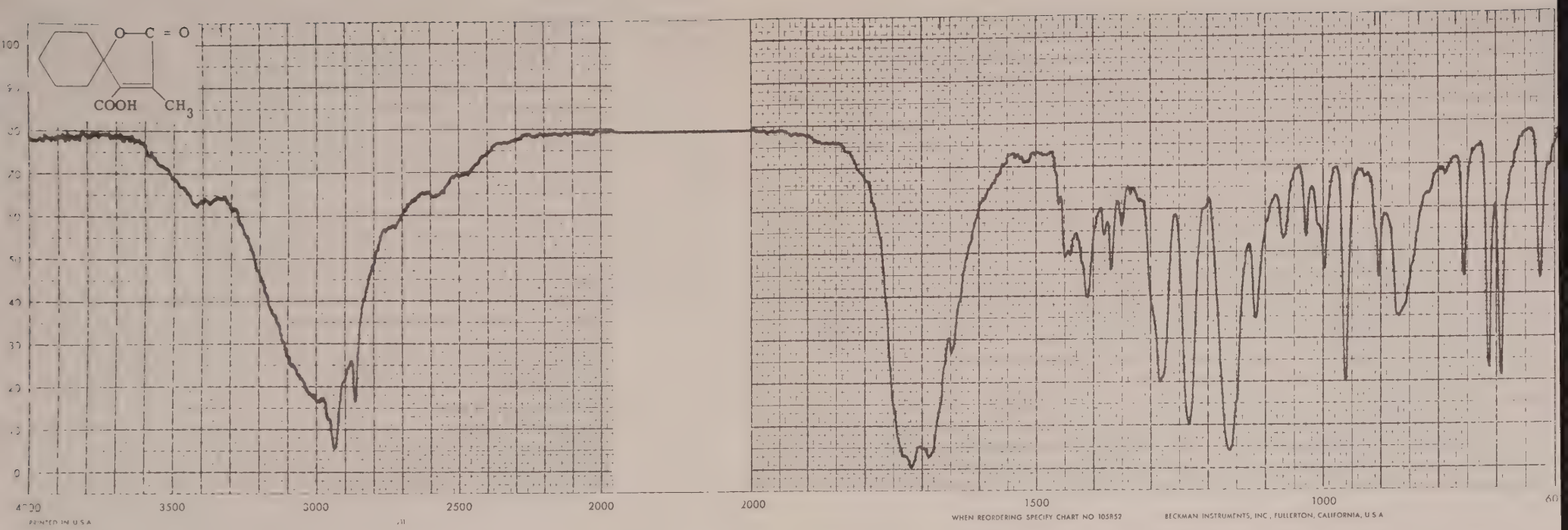
En ce qui concerne les esters IV et VII, la bande ν(C = 0) de la fonction ester se trouve à 1725 cm-1.

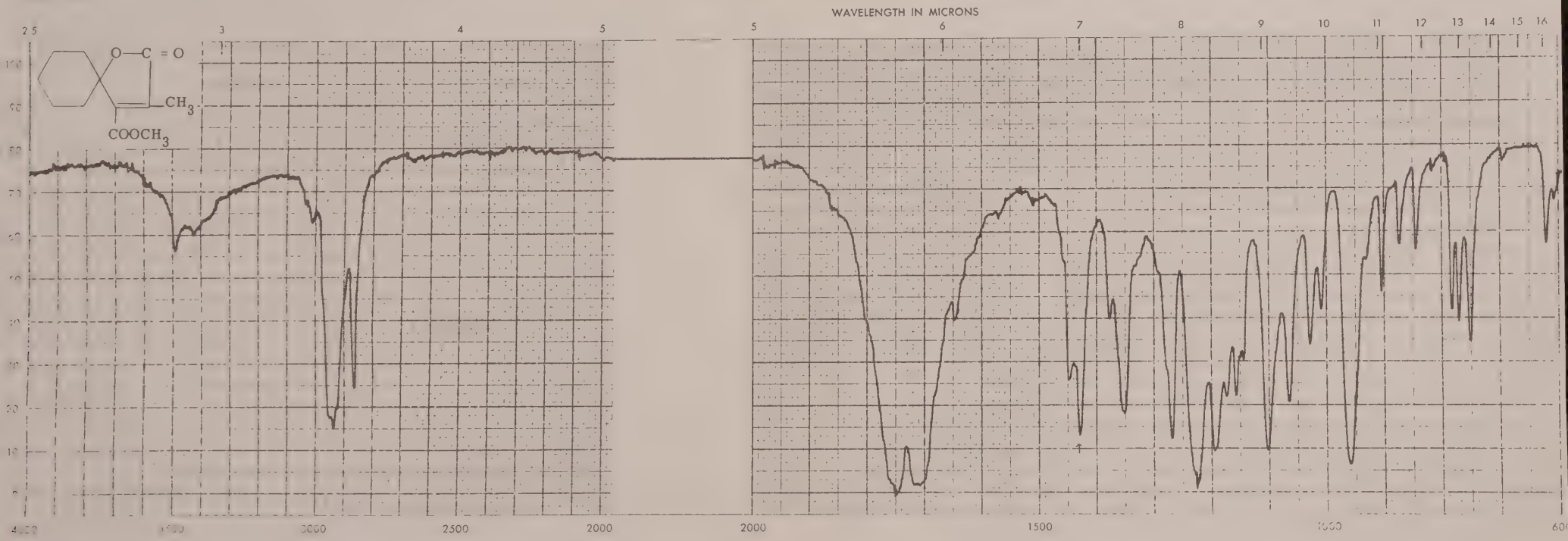
Enfin sur tous les spectres examinés, on peut encore noter l'existence d'une importante zone d'absorption entre 1300 et 1100 cm-1, cette zone correspond aux vibrations de valence ν (= C - O -) en relation avec la présence de la fonction lactone et des fonctions carboxyle ou ester.

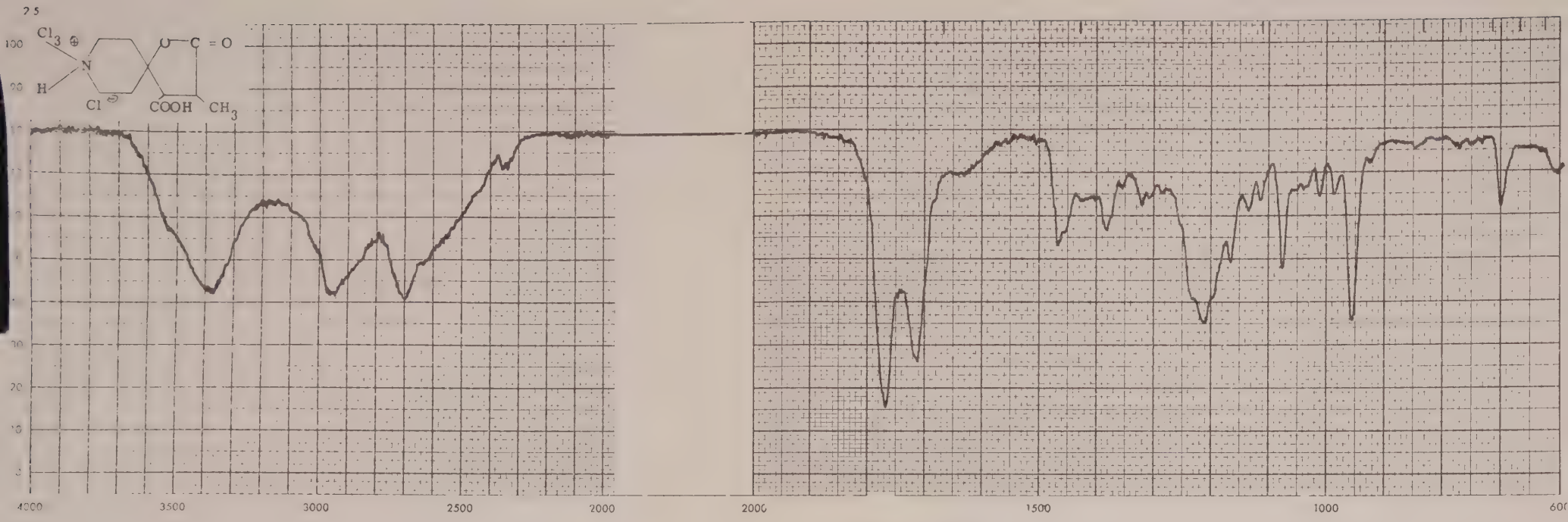


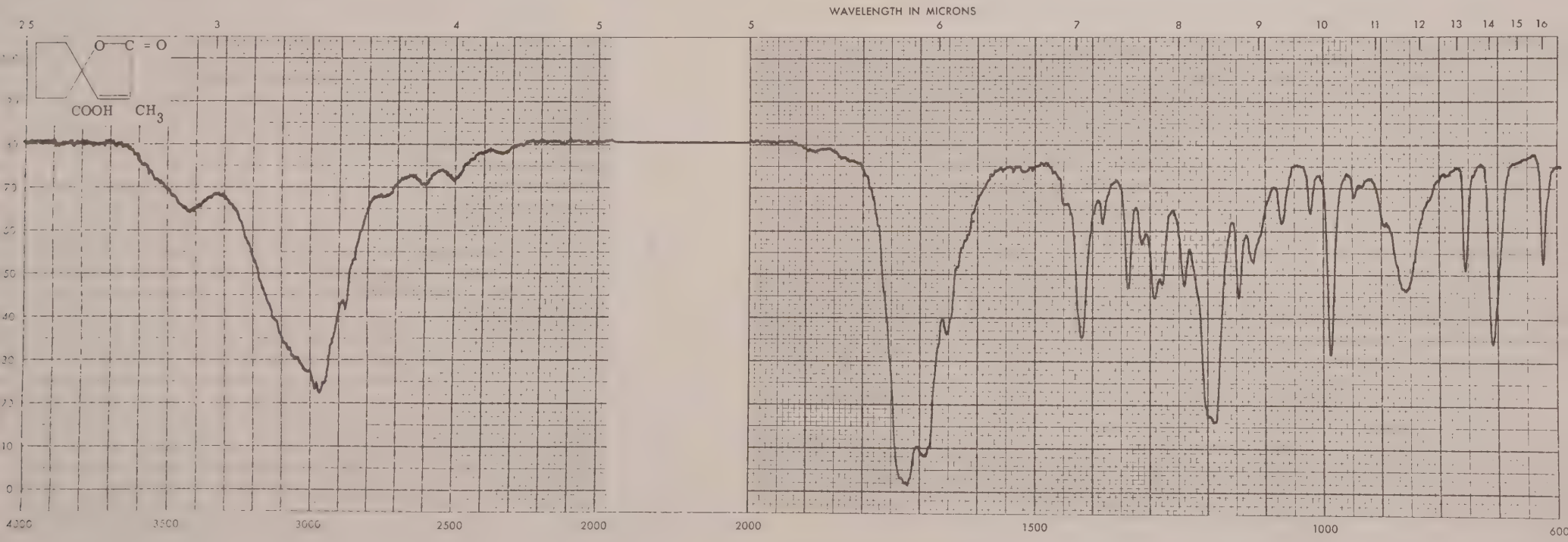
WAVELENGTH IN MICRONS

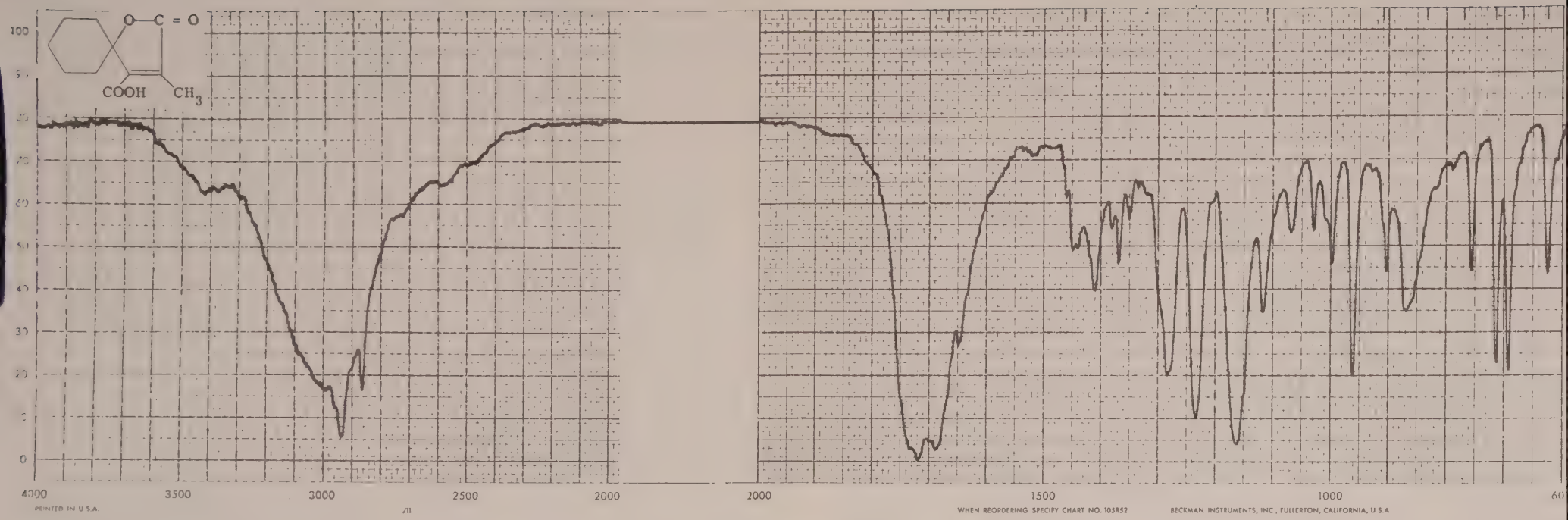


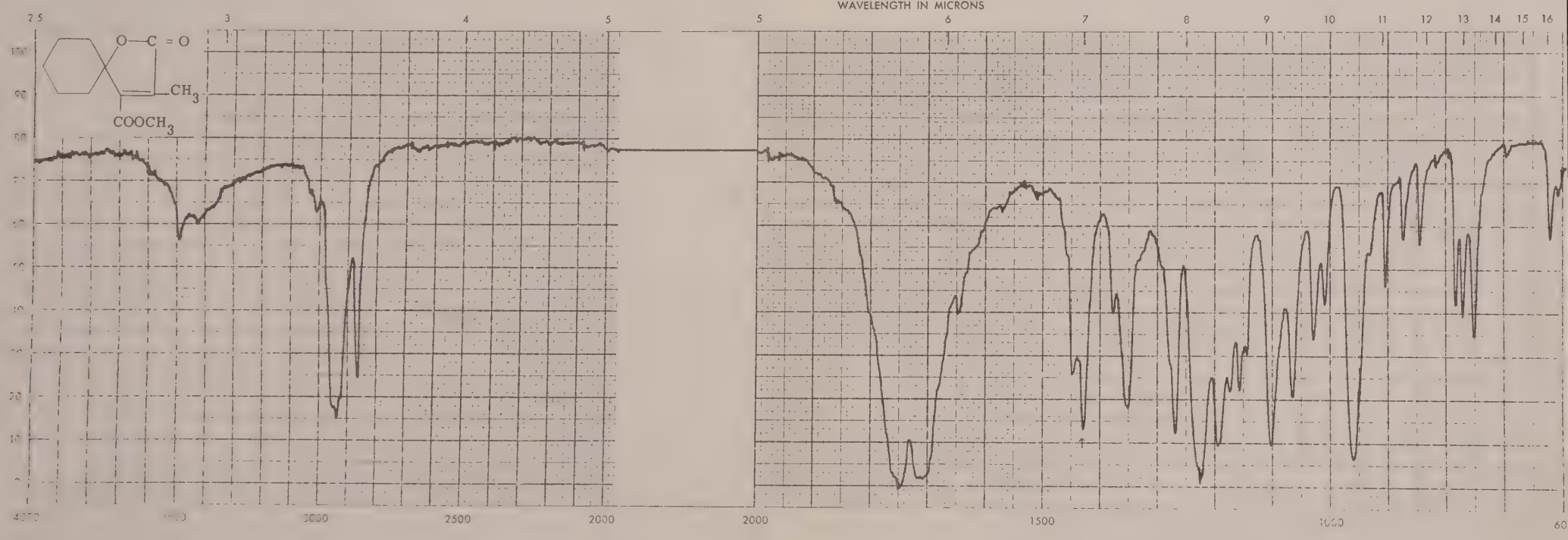

O—C = O
COOH
CH3
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
4000
3500
3000
2500
2000
2000
1500
1000
600
PRINTED IN U.S.A.
WHEN REORDERING SPECIFY CHART NO 105852
BECKMAN INSTRUMENTS, INC., FULLERTON, CALIFORNIA, U.S.A.

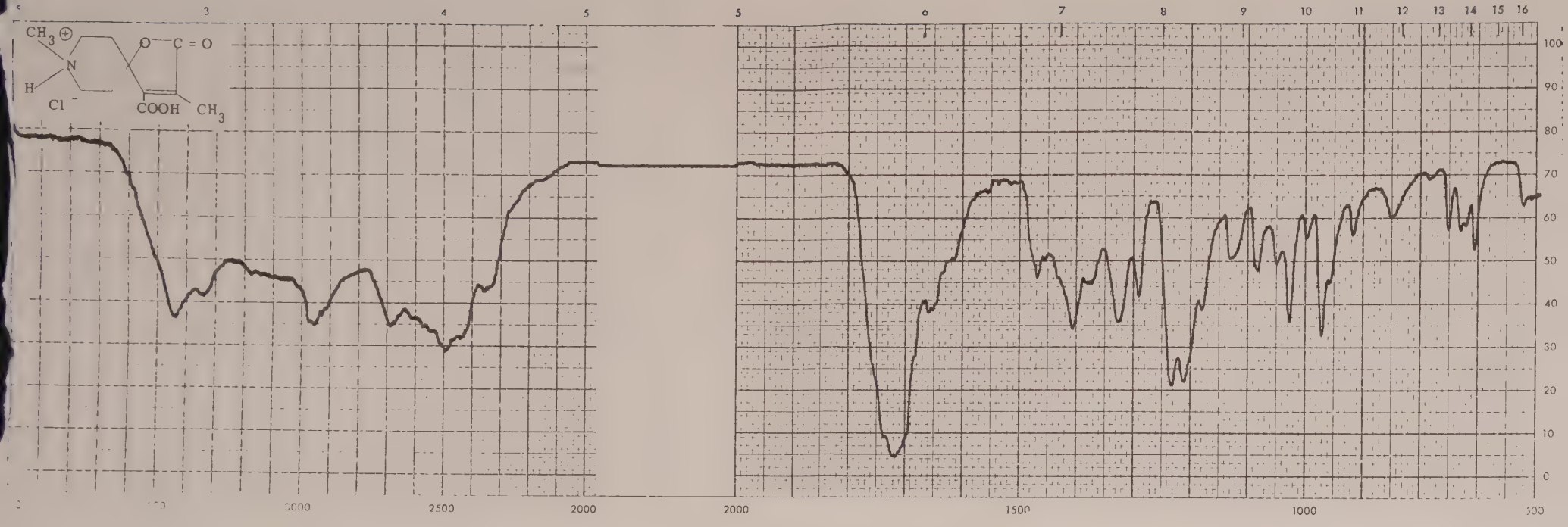

WAVELENGTH IN MICRONS
2.5
3
4
5
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
O—C = O
CH3
COOCH3
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
4000
3500
3000
2500
2000
2000
1500
1000
600

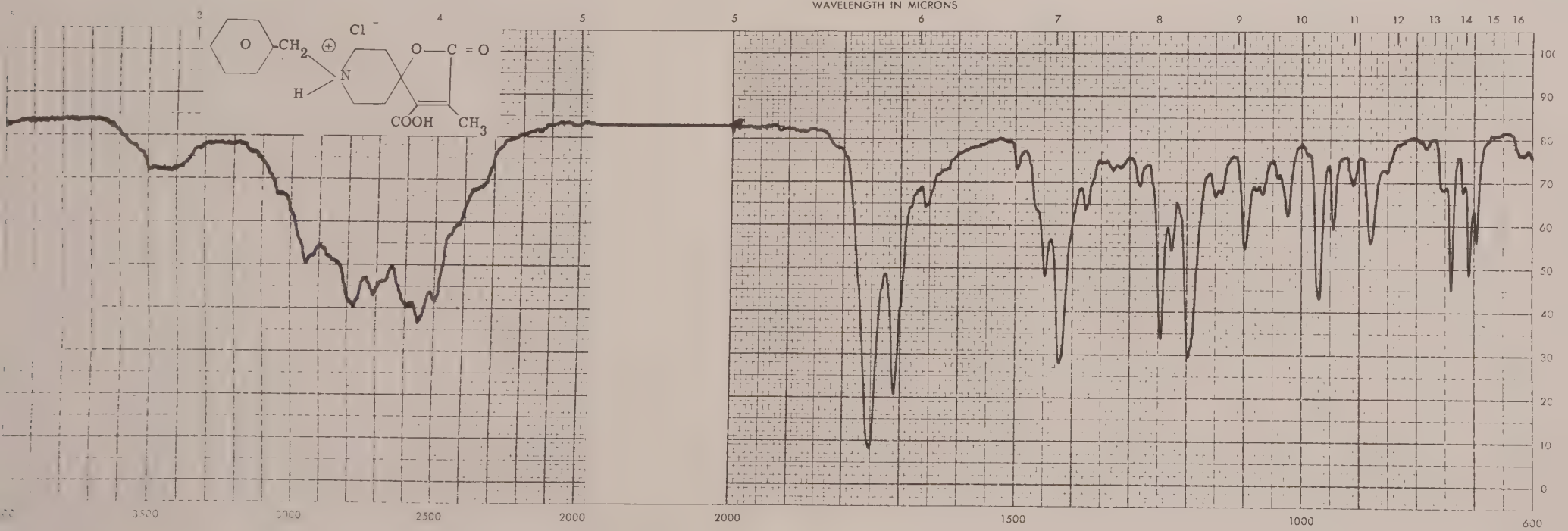

2.5
100
90
70
60
50
40
30
20
10
0
4000
3500
3000
2500
2000
2000
1500
1000
600


WAVELENGTH IN MICRONS
2.5
3
4
5
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
70
60
50
40
30
20
10
0
4000
3500
3000
2500
2000
2000
1500
1000
600


O—C = O
COOH
CH3
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
4000
3500
3000
2500
2000
2000
1500
1000
PRINTED IN U.S.A.
WHEN REORDERING SPECIFY CHART NO. 105R52
BECKMAN INSTRUMENTS, INC., FULLERTON, CALIFORNIA, U.S.A.


WAVELENGTH IN MICRONS
2.5
3
4
5
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
O—C = O
CH3
COOCH3
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
2500
2000
2000
1500
1000
60


3
4
5
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
2000
2500
2000
2000
1500
1000
500


WAVELENGTH IN MICRONS
3
4
5
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
3500
3000
2500
2000
2000
1500
1000
600

II - ENZYMOLOGIE

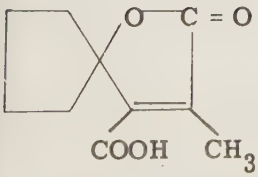
Au cours de travaux précédents, (16), nous avons pu mettre en évidence l'effet inhibiteur de phénylbutanolides et phénylbuténolides sur diverses réactions enzymatiques. Nous avons étudié l'action de ces composés sur les activités sorbitol déshydrogénasique (1. 1. 1. 14), lactate déshydrogénasique (1. 1. 1. 27), phosphatasiques alcaline (3. 1. 3. 1.) et acide (3. 1. 3. 2.) et adénosine triphosphatasique (3. 6. 1. 3.) au niveau du foie et du rein chez la souris. Dans le cas des phénylbuténolides nous avions pu noter une certaine relation entre l'activité et l'effet électronique de substituants, exprimé par la constante σ de Hammet (17).

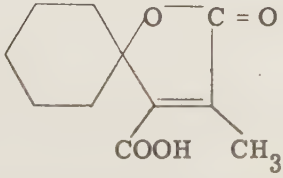
Parmi les composés que nous avons préparés, nous avons fait appel à ceux qui présentaient des structures moléculaires susceptibles d'interférer avec un ou plusieurs groupements fonctionnels des enzymes, ou avec un ou plusieurs sites actifs. Nous avons sélectionné trois produits :

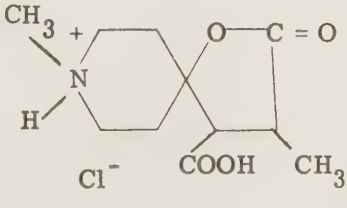
- le sel sodique du méthyl-2 carboxy-3 cyclopentanespiro-4 butène-2 olide-4 (IX).

- le sel sodique du méthyl-2 carboxy-3 cyclohexanespiro-4 butène-2 olide-4 (VI).

- le chlorure de méthyl-2 carboxy-3 (N méthylpiperidinium-4' spiro-) 4 butène-2 olide-4 (X).





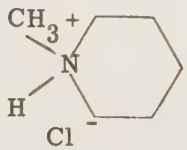


La fonction lactone de ces composés est susceptible de jouer le rôle de groupement haptophore et peut d'autre part, former des liaisons hydrogène par son carbonyle.

L'azote chargé positivement du dernier produit, peut être accepté par un site anionique.

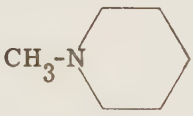
Nous avons pensé qu'en comparant l'activité des produits VI et IX avec l'activité du produit X, nous pourrions voir quelle était la part qui revenait à la fonction lactone et celle que l'on pouvait attribuer à l'azote chargé.

Pour préciser le rôle de ce dernier groupement, il nous a paru utile d'étudier l'activité du chlorhydrate de méthyl-1 pipéridine (A) :



A

Enfin, pour voir quelle pouvait être l'influence de la charge portée par l'azote, nous avions pensé tester la méthyl - 1 pipéridine (B) :



B

mais l'alcalinité de ce dernier composé nous en a interdit l'emploi.

Nous avons étudié l'action de ces différents produits sur trois activités enzymatiques choisies en fonction de données réelles ou hypothétiques concernant la structure de leurs sites actifs : présence de groupements thiols (156) et de groupements aminés terminaux (147)dans la lactate déshydrogénase et l'adénosine triphosphatase ; présence d'un site actif anionique et d'un site estérasique dans les cholinestérases (20).

Ces études enzymologiques ont été conduites in vitro à 37° C, à partir d'enzymes naturelles fournies par des homogenats de foie, de rein et de cerveau de rats blancs de souche SPRAGUE DAWLEY. Les animaux sont tués par décapitation, les organes sont prélevés, lavés de leur sang et homogénéisés à l'Ultra-Turrax dans l'eau à 0° C. Les homogenats sont utilisés après dilution du 1/5e au 1/1000e suivant l'étude considérée. Les différents composés sont introduits aux concentrations de 2 à 2,5 g par litre, au début de la réaction.

CHAPITRE I

ACTIVITE LACTATE DESHYDROGENASIQUE

(Lactate déshydrogénase 1.1.1.27)

La lactate déshydrogénase isolée sous forme cristallisée à partir de nombreux tissus (88) (120) (211) est une oxydo-réductase à NAD^+ dont la composition en amino-acides a été déterminée chez plusieurs espèces animales (65). Cette enzyme catalyse la transformation du pyruvate en lactate, terme ultime du catabolisme anaerobie des glucides :

$$CH_3 - CHOH - COOH + NAD^+ \rightleftharpoons CH_3 - CO - COOH + NADH + H^+$$

L'équilibre de la réaction est en faveur de la formation d'acide lactique :

$$\frac{\text{pyruvate}\ \ NADH + H^+}{\text{lactate}\ \ NAD^+} = 2,76\ 10^{-12} \quad (189)$$

On sait aujourd'hui qu'il existe 5 isoenzymes de la lactate déshydrogénase, classées suivant leur mobilité électrophorétique entre pH 7 et 9, la LDH 1 étant la plus fortement électronégative (126).

L'action de divers effecteurs au niveau de ce système enzymatique a fait l'objet de nombreux travaux. Parmi les inhibiteurs étudiés, certains présentent une analogie structurale avec le NAD^+ comme la 3 benzoyl pyridine et le thionicotinamide (2). C'est également le cas du composé azoté (X) que nous avons préparé, dans lequel l'azote chargé et la fonction acide carboxylique portée par l'anneau lactonique sont parfaitement superposables à l'azote et à une fonction acide phosphorique du NAD^+. Aussi avons-nous pensé que ce produit pourrait interférer avec l'activité lactate déshydrogénasique, plus précisément au niveau de la liaison entre l'enzyme et le coenzyme.

Nous avons également testé les lactones VI et IX et le chlorhydrate de méthyl-1 pipéridine (A). Nous avons étudié l'action de ces composés, tant sur la réduction du pyruvate, que sur l'oxydation du lactate. Parmi les nombreuses méthodes de dosage, nous avons retenu la technique de CABAUD et WROBLEWSKI (41) modifiée par BASTIDE et coll. (14).

A - REDUCTION DU PYRUVATE EN LACTATE.

1) Principe.

La lactatedéshydrogénase transforme à pH = 7,8 et en présence de $NADH + H^+$, l'acide pyruvique en acide lactique, avec formation de NAD^+ .

L'acide pyruvique non réduit donne avec la 2-4 Dinitro-phénylhydrazine, une hydrazone colorée, que l'on apprécie à 400-550 mμ au photocolorimètre en milieu sodique.

2) Réactifs.

- Tampon phosphate à pH 7,8.
  - Solution A : KH_2PO_4 M/15 à 9,078 g/l.
  - Solution B : $Na_2HPO_4, 12\ H_2O$ M/15 à 23,870 g/l.

On mélange 91,5 cm3 de B et 8,5 cm3 de A. On vérifie le pH.

- Solution de pyruvate de sodium 0,002 M, soit 220 mg/l.

Cette solution de pyruvate dans le tampon se conserve quinze jours au maximum.

- Solution de Nicotinamide-Adénine-dinucléotide réduit (NADH + H^+), à 10 mg pour 1 cm3 d'eau distillée.

On met 0,1 cm3 de cette solution dans chaque tube à incuber. Cette solution, préparée dans un bain de glace, est à utiliser immédiatement.

- Solution de soude 0,4 N (16 g/l)

- Solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine

2-4 dinitrophénylhydrazine : 200 mg
Acide chlorhydrique concentré : 85 cm3
Eau distillée : q. s. p. 1 litre de réactif.
Conserver à + 4° C à l'obscurité.

3) Technique.

Dans chaque tube on introduit 0,5 cm3 de la solution de pyruvate de sodium et on laisse quelques secondes à 37° C.

On ajoute ensuite :

- 0,3 cm3 d'une solution à 10 g/l dans le tampon du produit à étudier.
- 0,2 cm3 d'eau distillée.
- 0,1 cm3 de solution enzymatique.
- 0,1 cm3 de solution de NADH + H^+

Dans le témoin les 0,3 cm3 de la solution de produit sont remplacés par 0,3 cm3 de tampon.

On place les tubes au bain-marie à 37° C, pendant 30 minutes.

On arrête la réaction en ajoutant 1 cm3 de solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine. Après agitation les tubes sont sortis du bain-marie et abandonnés 20 minutes à la température du laboratoire. On ajoute alors 10 cm3 de soude 0,4 N, on agite et on passe au photocolorimètre à 525 mμ , au bout de cinq minutes au minimum, trente minutes au maximum.

La gamme étalon est réalisée en répartissant dans différents tubes : 0, 0,1, 0,2 ----- 0,9, 1 cm3 d'une solution de pyruvate 0,001 M (110 mg/l) et 1,2 , 1,1, 1, ------0,3, 0,2 cm3 d'eau distillée ce qui correspond à des pourcentages d'activité allant de 100 à 10.

4) Résultats.

Les produits VI et IX diminuent l'activité enzymatique dans les trois organes étudiés. Le produit X manifeste au contraire un fort pouvoir activateur.

Le chlorhydrate de N méthyl pipéridine augmente également l'activité lacticodéshydrogénasique mais de façon beaucoup moins importante.

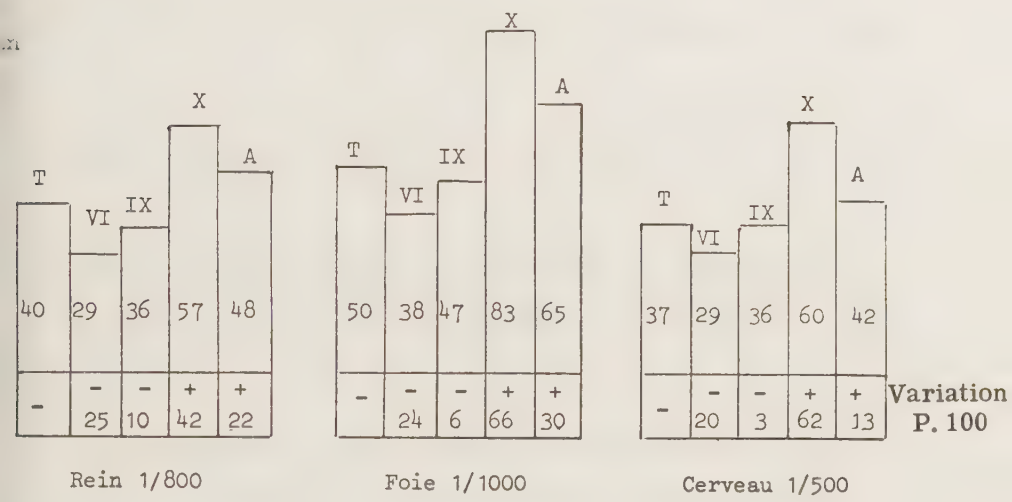
Activité lactatedéshydrogénasique en μmoles de pyruvate réduit par minute et par gramme de tissu frais.

	Témoin	Produit VI	Produit IX	Produit X	Produit A
Rein 1/800	106,6	77,3	96	152	128
Foie 1/1000	166,6	126,6	156,6	276,6	216,6
Cerveau 1/500	61,6	48,3	60	100	70

Lactate déshydrogénase.

Pourcentage de pyruvate réduit en 30 minutes.

T = Témoin



Rein 1/800 Foie 1/1000 Cerveau 1/500

B - OXYDATION DU LACTATE EN PYRUVATE.

Nous avons utilisé la même méthode que précédemment mais en opérant à pH = 10 en présence de NAD^+. Nous avons apprécié la quantité d'acide pyruvique formé à partir de l'acide lactique, par formation d'une hydrazone colorée en présence de 2-4 dinitrophénylhydrazine.

Nous avons utilisé les solutions de coenzyme, tampon et substrat suivantes :

- Nicotinamide - Adénine dinucléotide à 10 mg pour 1 cm3 d'eau distillée.
- Tampon glycocolle à pH = 10.

  Glycocolle : 7,5 g
  NaCl : 5,85 g
  Eau distillée q. s. p. 100 cm3

- Substrat lactate.

Lactate de sodium à 70 p. 100 : 5 cm^3
Tampon glycocolle : 125 cm^3
Soude 0,1 N : 75 cm^3

Les autres réactifs et la technique sont identiques à ceux décrits précédemment.

Résultats.

Tous les produits testés manifestent un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l'oxydation du lactate.

Les deux lactones VI et IX ont une action comparable à celle du chlorhydrate de N méthyl pipéridine (A) alors que le produit X; qui possède à la fois la fonction lactone et l'azote chargé, présente une activité beaucoup plus forte.

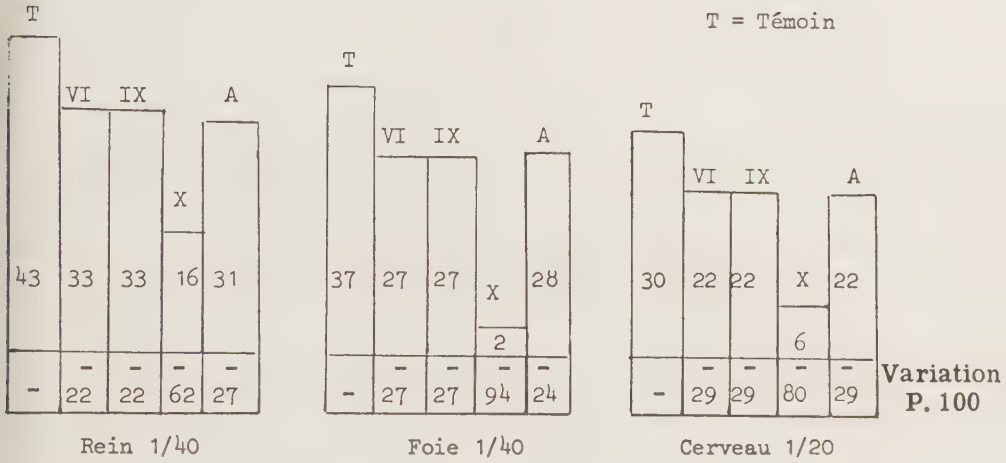
- Activité lactate déshydrogénasique en μmoles de lactate oxydé par minute et par gramme de tissu frais. -

	Témoin	Produit VI	Produit IX	Produit X	Produit A
Rein	2,86	2,2	2,2	2,06	1,66
Foie 1/40	2,46	1,8	1,8	0,13	1,86
Cerveau 1/20	1	0,73	0,73	0,2	0,73

- Lactate déshydrogénase -

- Pourcentage de lactate oxydé en 60 minutes -

T = Témoin.

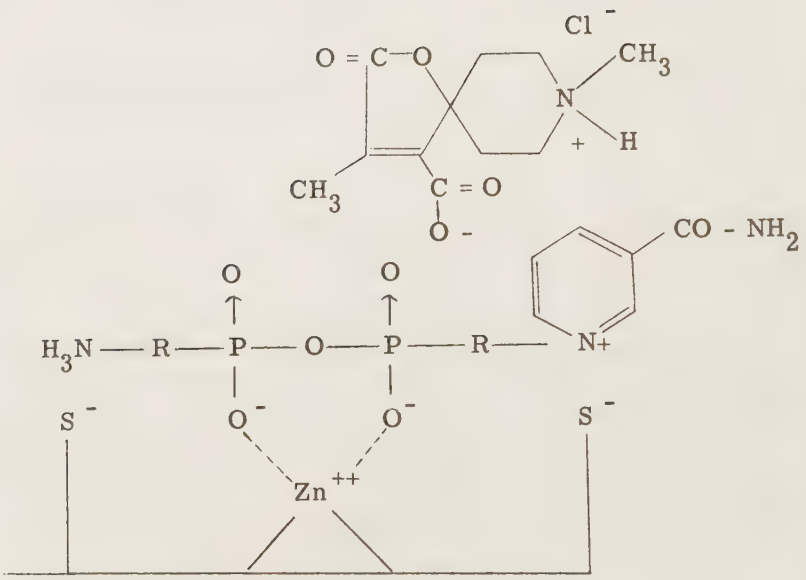


C) CONCLUSION

Le mode de fixation du NAD^+ sur la protéine enzymatique a surtout été étudié dans le cas de l'alcool déshydrogénase.

Pour certains auteurs (230), un atome de Zn, faisant partie de la structure de l'apoenzyme, se fixerait par liaison électrovalente, à l'anion pyrophosphate du coenzyme. Ce dernier par son azote pyrimidique et le groupement aminé de l'Adénine pourrait, d'autre part, échanger les liaisons ioniques avec des fonctions thiols de l'enzyme

Si l'on reprend le schéma représentant le mode de fixation possible du NAD^+ sur la protéine enzymatique (181), on peut supposer que l'acide spirolactone carboxylique azoté que nous avons préparé (X), entre en compétition avec le coenzyme en deux points du site actif :



L'azote chargé pourrait se lier à une fonction thiol de l'enzyme au lieu et place de l'azote pyrimidique ; le carbonyle pourrait de son côté s'unir par une liaison ionique à la fraction métallique de l'enzyme. Il n'est pas exclu que ce type de liaison soit complété ou remplacé par l'interaction d'un second carbonyle carboxylique résultant de l'ouverture de l'anneau lactonique. La construction de modèles moléculaires dans l'espace permet d'accréditer de telles hypothèses.

Le chlorhydrate de N méthyl pipéridine n'entrerait en compétition qu'au niveau d'un seul site, ce qui pourrait expliquer son action plus faible sur ce système enzymatique. Ces deux composés freinent la réaction dans le sens lactate pyruvate, qui est précisément celui dans lequel intervient le NAD^+.

Plus délicate est l'interprétation de l'action des composés VI et IX; en l'absence d'azote chargé, l'interaction la plus probable s'exercerait au niveau d'un des deux carbonyles.

CHAPITRE II

ACTIVITE ADENOSINE TRIPHOSPHATASIQUE

Adénosine Triphosphatase : 3. 6. 1. 3

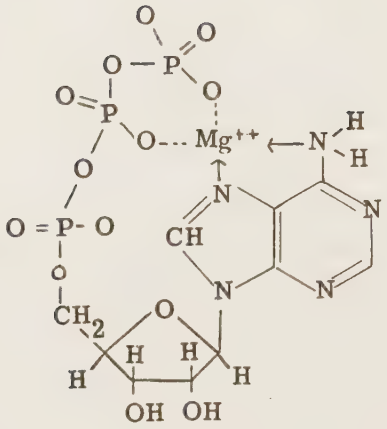
L'adénosine triphosphatase catalyse la transformation :

$$ATP + H_2O \longrightarrow ADP + H_3PO_4$$

Elle accepte également comme substrat l'ITP, le GTP et l'UTP. La réaction d'hydrolyse de l'ATP s'accompagne de la libération de 8 K cal. M^{-1}.

Cette enzyme largement distribuée est localisée en particulier au niveau des mitochondries, des microsomes de la membrane cellulaire, de la myosine et de l'actomyosine.

L'ATPase mitochondriale, agent de couplage des phosphorylations oxydatives a fait l'objet de nombreux travaux (159) (160) (173) 214). Certains auteurs se sont penchés sur sa biogênèse (224), sur son activation par les ions calcium et magnésium (226) (227) qui formeraient avec l'ATP un complexe dont la structure probable est la suivante (130)



De nombreux chercheurs ont étudié, d'autre part, l'influence sur cette enzyme et divers effecteurs : agents découplants des phosphorylations oxydatives, tels l'oligomycine (113) (157) (225) et les arséniates (49) (232), substances agissant au niveau des groupements sulfhydrylés comme la digitonine (45). Enfin PULLMAN (172) a isolé et purifié à partir des mitochondries, une protéine de faible poids moléculaire, qui semble être un inhibiteur spécifique de l'ATPase mitochondriale.

L'ATPase membranaire, qui joue un rôle important dans le transport du sodium et du potassium (1) est inhibée en particulier par l'ouabaïne (189) (197) comme nous l'avons déjà signalé (66) (179) (239).

Il en est de même pour l'ATPase microsomale (148).

L'ATPase de la myosine, qui possède au niveau de son site actif des groupements sulfhydrylés (11), a fait l'objet d'une revue détaillée (119). Parmi les différents effecteurs susceptibles de modifier son activité on trouve, en dehors des ions monovalents (195) et de certains métabolites (9), de nombreux composés de structure plus ou moins complexe (27) (28), certains agissant au niveau de groupements animés (122), d'autres comme l'acide paramercuriphényl sulfonique et la N-éthyl maléimide au niveau des groupements thiols (196).

C'est essentiellement l'interférence possible de la fonction lactone au niveau de ces mêmes groupements (221), qui nous a conduit à tester l'activité de nos produits sur l'ATPase. Nous avons choisi comme méthode de dosage la technique de PERRY (159), modifiée par DASTUGUE et coll. (52).

A - PRINCIPE -

L'adénosine triphosphatase est dosée par estimation colorimétrique du phosphate inorganique libéré par l'enzyme à partir de l'ATP, en présence d'ions calcium.

B - REACTIFS -

ATP 0,05 M (sel disodique) à pH = 6,8 soit 3,115 g. pour 10cm3. Cette solution peut être conservée à - 15°C de nombreux mois sans hydrolyse appréciable.

Tampon Tris à pH = 7,8

Solution A : solution de tri (méthyl hydroxy) amino méthane 0,2M (24,2g/l)

Solution B : HCl 0,2N

- Mélanger 25 cm3 de A et 16,3 cm3 de B. Compléter à 100 cm3 avec l'eau distillée.
- Chlorure de calcium 0,1M à 11,1g/l

- Acide trichloracétique à 15 p. 100
- Solution de molybdate acide d'ammonium à 5 p. 100 dans H_2SO_4 3N.

Molybdate d'ammonium	5 g.
H_2SO_4 C°	14,7 g.
Eau distillée q. s. p.	100 cm3

- Réactifs de Fiske et Subbarow

Acide amino-1 naphtol-2 sulfonique-4	0,2	g.
Métabisulfite de sodium	12	g.
Sulfite anhydre de sodium	1,2	g.
Eau distillée q. s. p.	100	cm3

C - TECHNIQUE -

Dans chaque tube on introduit :

- 2,5 cm3 de Tampon Tris.
- 0,5 cm3 d'une solution à 20 g/l dans le tampon du produit à tester.
- 0,3 cm3 de la solution d'ATP
- 0,2 cm3 de la solution de $CaCl_2$
- 0,5 cm3 de solution enzymatique

Dans les tubes témoins, on remplace la solution de produit par 0,5 cm3 d'eau distillée.

On met les tubes au bain-marie à 37°C, pendant 15 minutes.

On stoppe la réaction par addition rapide de 1 cm3 d'acide trichloracétique à 15 p. 100.

Après centrifugation, on prélève dans chaque tube 0,66 cm3 de surnageant que l'on complète à 1 cm3 avec de l'eau distillée.

A chaque prise d'essai, on ajoute 1 cm3 de molybdate d'ammonium en milieu sulfurique, puis 3 cm3 d'eau distillée, 0,5 cm3 de réactif de Fiske et Subbarow et l'on complète à 10 cm3 avec de l'eau distillée. Après cinq minutes, on passe au photocolorimètre à 650 mμ.

La gamme étalon est réalisée en répartissant dans différents tubes : 0; 0,1; 0,2; 0,3; --------0,9 1cm3 d'une solution de KH_2 PO_4 à 218 mg./l et 1; 0,9 ----- 0,2 , 0,1; 0 cm3 d'eau distillée, ce qui correspond à des pourcentages d'activité allant de zéro à cent.

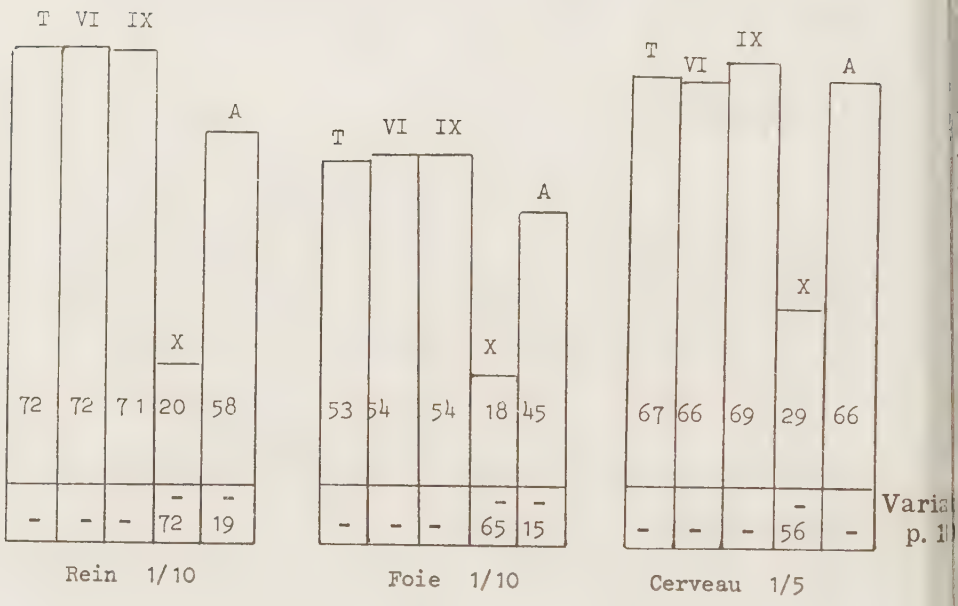
D - RESULTATS -

Les composés VI et IX sont sans effet sur l'activité ATPasique, alors que le produit X manifeste une action inhibitrice très nette au niveau des trois organes étudiés. Le chlorhydrate de N méthyl pipéridine se comporte également comme un inhibiteur de l'ATPase hépatique et rénale, mais semble inactif au niveau du tissu cérébral.

- Activité ATPasique en μmoles d'ATP hydrolysé par minute et par gramme de tissu frais.

	Témoin	Produit VI	Produit IX	Produit X	Produit A
Rein 1/10	14,4	14,4	14,2	4	11,6
Foie 1/10	10,6	10,8	10,8	3,6	9
Cerveau 1/5	13,4	13,2	13,8	5,8	13,2

- Adénosine Triphosphatase -
- Pourcentage d'ATP hydrolysé en 15 minutes.



E - CONCLUSION -

Il apparaît que la fonction lactone seule est sans action sur l'ATPase activée par les ions calcium. Ceci est en accord avec les observations de EVANS (66), qui avait montré que la Ca^{++} et la Mg^{++} ATPases n'étaient pas affectées par l'ouabaïne, alors que ce même composé est un effecteur puissant de la Na^{+} et K^{+} ATPase (179) (239) .

Les résultats obtenus avec le composé X et le chlorhydrate de méthyl-1 pipéridine, semblent plaider en faveur d'une liaison entre l'azote chargé et les groupements sulfhydrylés de l'enzyme, comme c'est le cas pour la lactate déshydrogénase.

Mais, d'autre part, le fait que les phospholipides, en particulier les lécithines, jouent un rôle important dans l'activité adénosinetriphosphatasique et le transfert des

ions calcium qui sont inhibés par la phospholipase C (141) permet de supposer que c'est peut-être au niveau de ces métabolites qu'interfèrent les deux produits actifs.

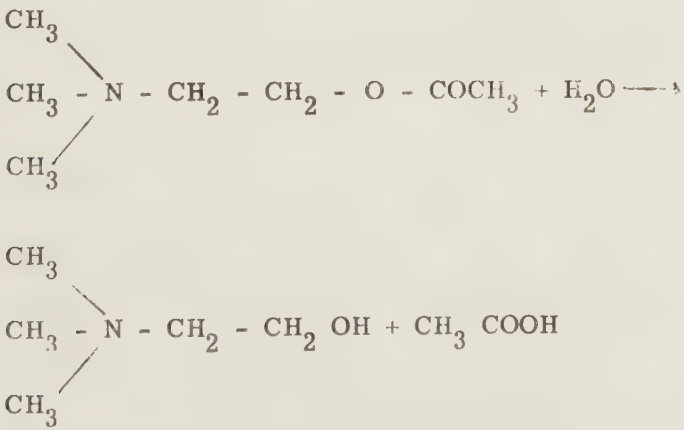
CHAPITRE III

ACTIVITES CHOLINESTERASIQUES

Acétyl cholinestérase : 3. 1. 1. 7.

Pseudo-cholinestérase : 3. 1. 1. 8.

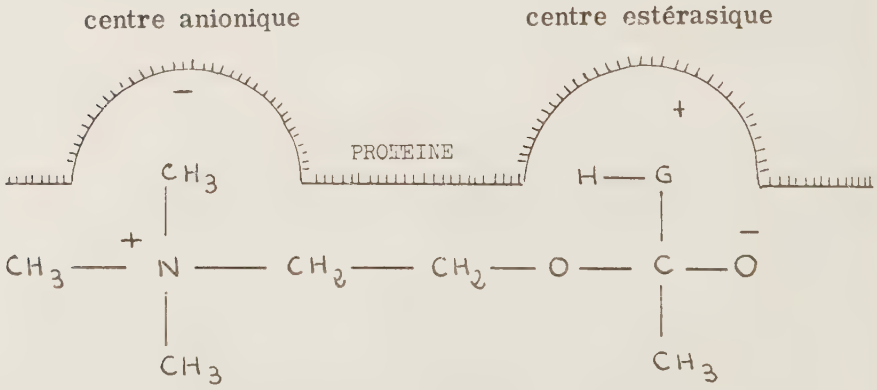
On s'est aperçu depuis longtemps que la cholinestérase sérique différait par son champ d'action de la cholinestérase que l'on peut mettre en évidence au niveau du système nerveux ou des érythrocytes. La première ou pseudo-cholinestérase est douée de larges propriétés hydrolytiques dont, en particulier, celle d'hydrolyser l'acétylcholine. La seconde ou cholinestérase vraie ou acétylcholinestérase (8), agit essentiellement sur l'acétyl β méthylcholine et l'acétylcholine selon le schéma suivant :



Parmi les revues d'ensemble publiées sur ce sujet, la plus importante à ce jour est celle de GEREBTZOFF (85). D'autre part, une étude très complète de ces deux systèmes enzymatiques a été faite par WILSON (235) et AUGUSTINSSON (7).

L'importance de ces enzymes est liée à l'importance physiologique de leur substrat, mais nous n'insisterons pas ici sur le rôle capital d'intermédiaire chimique joué par l'acétylcholine dans la transmission de l'influx nerveux pas plus que sur ses fortes propriétés hypotensives. Nous nous intéresserons surtout aux substances capables de potentialiser son action parmi lesquelles nous trouvons les inhibiteurs des cholinestérases.

On admet que la surface active de ces enzymes comporte un site anionique et un site estérasique au niveau desquels se fixerait l'acétylcholine, selon le schéma suivant (235) :



Les inhibiteurs puissants agiraient par compétition avec le substrat au niveau de cette surface active. Parmi les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, il en est qui agissent de façon irréversible, et c'est en particulier le cas de nombreux phosphates organiques (149) (235) ; il en est qui par contre manifestent un effet réversible : c'est le cas de certains amino-acides et peptides (23), de l'Esérine, de la Néostigmine et de plusieurs dérivés ammoniums quaternaires (20) (234). Dans ce même groupe de composés, la choline et la bétaïne se comportent comme des dépresseurs de l'activité pseudocholinestérasique (73). C'est essentiellement l'analogie de structure entre ces derniers effecteurs et le dérivé de la N méthyl pipéridine (X) que nous avons préparé, qui nous a conduit à étudier son action sur ce système enzymatique. Ce produit possède en effet un azote chargé susceptible d'interférer au niveau du site anionique et une fonction lactone voisine chimiquement de la fonction ester de l'Acétylcholine, pouvant peut-être se lier au site estérasique. Nous avons également testé les produits VI et IX et le chlorhydrate de N méthyl pipéridine (A). Nous avons choisi comme méthode de dosage la technique de VINCENT (231).

A - PRINCIPE -

L'acétylcholine non hydrolysée en fin d'incubation est dosée selon la méthode de HESTRIN, c'est-à-dire par évaluation de la coloration rouge qu'elle donne avec un mélange d'hydroxylamine et de perchlorure de Fer. On mesure d'une part, l'activité totale, d'autre part, l'activité cholinestérasique vraie, après inhibition de l'enzyme plasmatique par la diéthazine.

B - REACTIFS -

Tampon barbital à pH = 7,4

Solution A : barbital sodique 0,05M (10,31 g/l)

Solution B : HCl 0,05 N

On mélange 57 cm3 de solution A et 43 cm3 de solution B.

Solution d'Acétylcholine à 1 p. 1000 dans le tampon à pH = 7,4.

Cette solution est à préparer extemporanément.

Solution de chlorhydrate de diéthazine à 0,4 p. 1000 dans l'eau distillée.

Solution aqueuse d'acide trichloracétique à 10 p. 100

Solution d'acide chlorhydrique 4 N

Solution de chlorhydrate d'hydroxylamine

On mélange :

- 1 volume de chlorhydrate d'hydroxylamine à 13,9 p. 100.
- 2 volumes de soude 3,5 N

Cette solution est à préparer extemporanément.

Solution de perchlorure de fer 0,37 N dans HCl 0,1 N

- $FeCl_3$ RP à 27 p. 100 — 23 cm3
- HCl 0,1 N q.s.p. — 100 cm3

Cette solution se conserve à + 4°C.

C - TECHNIQUE -

Dans une première série de tubes à hémolyse, on introduit :

- 0,2 cm3 de solution enzymatique
- 3,4 cm3 de tampon
- 0,4 cm3 d'une solution à 20 g/l dans le tampon du produit à tester.

Dans une deuxième série, on met :

- 0,2 cm3 de solution enzymatique
- 0,1 cm3 de solution de chorhydrate de diéthazine

- 0, 4 cm3 d'une solution à 10 g/l dans le tampon du produit à tester.
- 3, 3 cm3 de tampon.

Dans les tubes témoins les 0, 4 cm3 de la solution de produit sont remplacés par 0, 4 cm3 d'eau distillée.

On chauffe les tubes à 37°C pendant 2 minutes. On ajoute alors dans les tubes 1 cm3 de solution d'Acétylcholine à 1 p. 1000 puis on les met au bain-marie à 37°C pendant deux heures.

En fin d'incubation, on ajoute 1 cm3 d'acide trichloracétique à 10 p. 100.

Après agitation et centrifugation, on prélève 3 cm3 de surnageant auxquels on ajoute 0, 4 cm3 de solution de chlorhydrate d'hydroxylamine. On attend deux minutes puis on ajoute à chaque prise d'essai :

- 0, 3 cm3 d'acide chlorhydrique 4 N
- 0, 2 cm3 de la solution de perchlorure de Fer
- 0, 5 cm3 d'eau.

La lecture est faite au photocolorimètre à 520 mμ .

Pour préparer la gamme étalon, on introduit dans une série de tubes à hémolyse 0; 0, 1; 0, 2 ----1 cm3 d'acétylcholine à 1 p. 1000 correspondant à des pourcentages d'hydrolyse allant de cent à zéro.

On introduit ensuite :

- Eau 0, 2 cm3
- Tampon q. s. p. 2 cm3
- Solution d'acide trichloracétique 1cm3.

On prélève 1, 5 cm3 et on procède à la coloration comme précédemment.

Les résultats obtenus correspondent pour les tubes de la première série à l'activité cholinestérasique to-

tale, pour les tubes de la deuxième série à l'activité cholinestérasique vraie. Par différence, on obtient le pourcentage d'activité pseudocholinestérasique.

D - RESULTATS -

Nous n'avons tenu compte que de l'activité cholinestérasique totale, l'activité cholinestérasique vraie étant faible et ses variations trop inconstantes.

Ici, comme dans le cas de l'ATPase, les produits VI et IX ne manifestent pas d'activité. Par contre le produit X entraîne une inhibition totale de l'activité cholinestérasique dans le foie et le rein alors qu'il diminue cette activité de 88 p. 100 dans le cerveau.

Le chlorhydrate de N méthyl pipéridine manifeste également un fort pouvoir inhibiteur au niveau des trois organes étudiés.

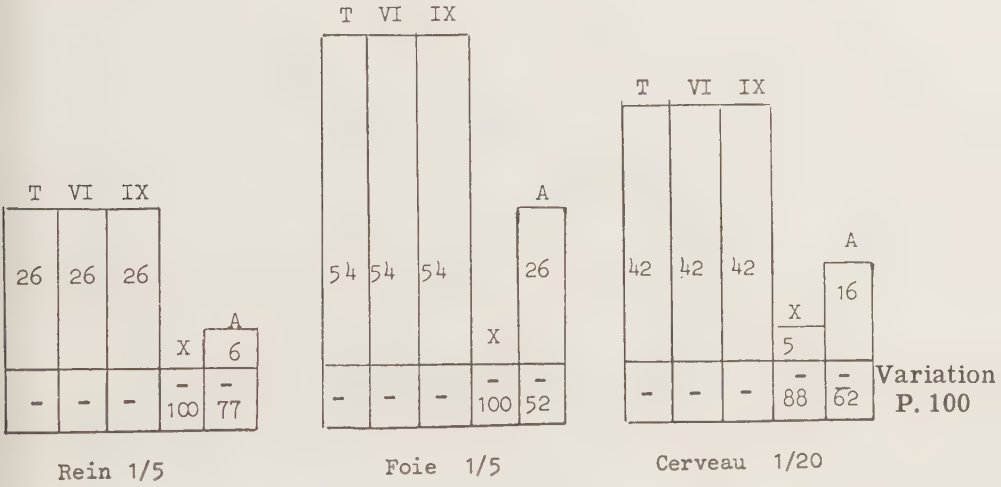
- Activité cholinestérasique en μ moles d'Acétylcholine hydrolysées par minute et par gramme de tissu frais -

	Témoin	Produit VI	Produit IX	Produit X	Produit A
Rein 1/5	0,029	0,029	0,029	0	0,0069
Foie 1/5	0,0621	0,0621	0,0621	0	0,029
Cerveau 1/20	0,193	0,193	0,193	0,023	0,073

Cholinestérases.

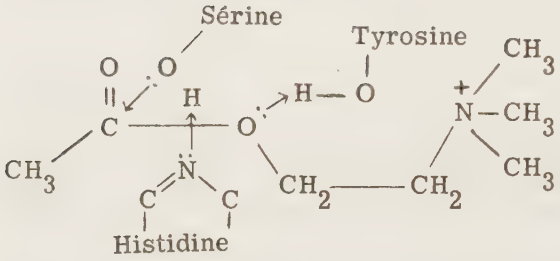
Pourcentage d'acétylcholine hydrolysée en 120 minutes.

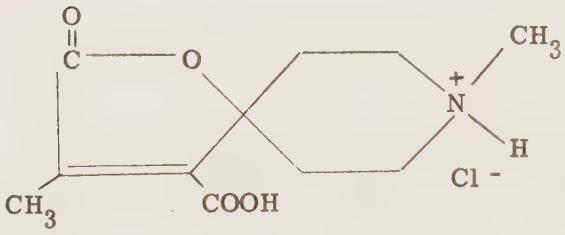
T = témoin.



E - CONCLUSION -

Si nous reprenons le schéma classique représentant le mode de fixation de l'acétylcholine au niveau du site actif des cholinestérases (180), nous voyons que le produit X peut interférer au niveau du site anionique et au niveau du site estérasique :





Nous avons vérifié cette possibilité sur des modèles moléculaires construits dans l'espace. L'azote et la fonction lactone du composé préparé, sont superposables à l'azote et à la fonction ester de l'acétylcholine, telle que nous l'avons représentée sur le schéma.

C'est sous cette forme que l'acétylcholine agirait au niveau des récepteurs nicotiniques (6).

L'action plus faible du chlorhydrate de N méthyl pipéridine, pourrait s'expliquer par son interférence au niveau du seul site anionique.

III - PHARMACOLOGIE

Nos investigations pharmacodynamiques ont été guidées par les indications bibliographiques et par les résultats enzymologiques. C'est la raison pour laquelle nous avons fait porter notre étude sur le composé X comportant l'anneau de la méthyl 1 pipéridine. Après une approximation de la DL 50 nous avons procédé à diverses explorations intéressant le système nerveux végétatif en raison de l'activité du produit sur les cholinestérases.

Nous avons aussi recherché sur l'iléon de cobaye isolé l'effet propre du produit, l'effet ganglioplégique vis-à-vis du spasme nicotinique et sur le duodénum de rat, l'activité spasmolytique.

Nous avons complété cette dernière exploration par le test de la chromodacryorrhée chez le rat.

L'action vasomotrice et les effets tensionnels ont été étudiés chez le lapin.

Nous avons enfin ajouté la détermination de l'activité anesthésique locale de surface et l'étude de l'action du produit vis-à-vis de l'effet contracturant de l'acetylcholine sur la musculature dorsale de la sangsue.

CHAPITRE I

TOXICITE AIGUE PRELIMINAIRE

La toxicité aigüe préliminaire du produit X a été recherchée chez la souris sur les lots de 5 souris de 18-20 g. " Iffa Carworth ", soumises à un régime alimentaire identique : Provende UAR, eau fraîche à volonté.

Le produit X est administré par voie I. P. sous forme de solution à 10 p. 100 aux doses respectives suivantes : 0,500 - 0,612 - 1,25 - 2,5 g. par kg. de poids.

La mortalité est la suivante :

- 0,50 g. par kg.	0 % en 48 heures
- 0,612 g. p. kg.	0 % en 48 heures
- 1,25 g. p. kg.	100 % en 48 heures
	20 % en 24 heures
- 2,5 g. p. kg.	100 % en 24 heures

On peut en déduire que la DL 50 par voie I. P. chez la souris est comprise entre 0,60 et 1,20 g. p. kg.

Le comportement des animaux est le suivant :

Après injection du produit X, les doses fortes entraînent une perte de l'équilibre avec disparition du réflexe de rétablissement après retournement, état de somnolence ; cet effet est net avec les doses de 0,50 g. à 0,75 g. par kg.

Chez ces mêmes animaux, la température rectale a été suivie à l'aide du thermomètre " Ellab " type PUC (Electrolabotoriet Copenhague). Il a été noté un abaissement de température de 1°C chez chaque animal, une heure après injection de produit X.

CHAPITRE II

RECHERCHE DE L'EFFET PROPRE ET DES EFFETS GANGLIOPLEGIQUES VIS-A-VIS DU SPASME NICOTINIQUE SUR L'ILEON ISOLE DE COBAYE

A - PRINCIPE - (43) (136)

Pour la recherche de l'effet propre des doses croissantes de produits à tester sont mises en présence de l'organe isolé durant 3 minutes puis un lavage est effectué avant de passer à l'essai de la dose suivante.

- L'effet antinicotinique est recherché vis-à-vis des spasmes provoqués par une solution de salicylate de nicotine.

B - TECHNIQUES -

1 - Choix du matériel

Le montage de ces préparations a nécessité l'emploi d'un bain-marie thermostatique type Valette (Ets JOUAN) pour organes isolés d'animaux homéothermes.

2 - Choix des réactifs

Liquide de Tyrode :

- Chlorure de sodium	8 g.
- Chlorure de Potassium	0,2 g.
- Chlorure de Calcium	0,2 g.
- Chlorure de Magnésium	0,1 g.
- Glucose	1 g.
- Carbonate monosodique façon à ajuster le pH à 7,2	1 g. environ de
- Eau bidistillée q. s. p.	1000 cm3.

En pratique faire une solution mère 10 fois concentrée, des 4 premiers sels minéraux que l'on dilue au 1/10e dans l'eau bidistillée et à laquelle on ajoute glucose et Na HCO_3. Toutes les solutions des substances à essayer sont effectuées dans le liquide de Tyrode.

3 - Choix des animaux

Un cobaye de 300 g. environ est sacrifié par section des carotides; on prélève rapidement par laparotomie médiane un fragment de la portion terminale d'iléon (près coecum) (10 cm.) qui est libéré du mésentère et débarrassé de son contenu par lavage à la seringue. Un fragment de 1,5 cm de long est installé dans une cuve de 20 cm3 de capacité. On laisse reposer 30 minutes au minimum, en renouvelant le liquide de Tyrode oxygéné.

C - RESULTATS -

Effet propre.

Pour des doses allant de 0,05 mg. à 10 mg. le produit X présente un effet inhibiteur du péristaltisme qui est particulièrement net dès la dose de 5 mg. Pour des doses supérieures à 10 mg., l'effet toxique se manifeste par une diminution du tonus de l'organe très nette entre 10 et 80 mg. sans retour de l'organe à sa position initiale.

Effets ganglioplégiques.

Le produit X inhibe le spasme nicotinique (300 à 400 γ de nicotine) de façon totale à des doses très élevées comprises entre 10 et 20 mg. pour les 25 cm3 de la cuve d'expérience. Pour des doses plus faibles non toxiques, l'inhibition est inconstante, quasi négligeable.

CHAPITRE III

ACTIVITE SPASMOLYTIQUE SUR L'INTESTIN ISOLE

(Duodénum de Rat)

A - PRINCIPE -

En comparant les résultats obtenus vis-à-vis des spasmes provoqués sur l'intestin isolé par l'acétylcholine, parasympathominétique type ou par le chlorure de baryum qui agit seulement sur le muscel lisse, il sera possible de discriminer le caractère prédominant que risque éventuellement de posséder la substance à étudier à l'égard des deux grandes classes de spasmolytiques cités et d'apprécier quantitativement son activité (43) (136).

B - TECHNIQUE -

1 - Choix du matériel

Le montage de ces préparations a nécessité l'emploi d'un bain-marie type Valette (Ets JOUAN) pour organes isolés d'animaux homéothermes.

2 - Choix des réactifs.

Liquide de Tyrode :

- Chlorure de sodium	8 g.
- Chlorure de potassium	0,2 g.
- Chlorure de Calcium	0,2 g.

- Chlorure de magnésium 0,1 g.
- Glucose 1 g.
- Carbonate monosodique 1 g. environ de façon à ajuster le pH à 7,2
- Eau bidistillée q. s. p. 1000 cm3.

En pratique, faire une solution mère 10 fois concentrée des 4 premiers sels minéraux que l'on dilue au 1/10 e dans l'eau bidistillée et à laquelle on ajoute glucose et $NaHCO_3$. Toutes les solutions des substances à essayer sont effectuées dans le liquide de Tyrode.

3 - Choix des animaux

Préparation du duodénum de Rat

Sur un rat blanc de race Wistar d'un poids de 150 à 200 g., à jeun depuis 24 heures, saigné par section des carotides, on prélève rapidement par laparotomie médiane un fragment de 6 à 10 cm. de duodénum, libéré de son mésentère, dès la fin de l'estomac en éliminant toutefois le sphincter pylorique. Immergé sans tarder dans le bain de Tyrode froid, il est vidé de son contenu par lavages successifs à la seringue. On isole un fragment de 1 à 2 cm. limité à ses deux extrémités par deux ligatures lâches qui serviront secondairement à le relier à la tige support et au levier du myographe.

Ainsi paré, l'organe est installé dans la cuve d'expérimentation remplie de tyrode jusqu'au trait de jauge (28 cm3) et convenablement aéré, la cuve étant toujours plongée dans le bain thermostatique réglé à 38,5°C. L'intestin isolé y est abandonné à un repos de vingt minutes, environ, interrompu seulement par plusieurs lavages au Tyrode tiédi à 38,5°C. L'expérimentation commence lorsque le segment est stabilisé, la décontraction achevée.

4 - Protocole expérimental

a) - Action sur la motilité spontanée

Examiner l'effet propre de doses croissantes de la substance à essayer.

b) - Activité spasmolytique

Rechercher la dose de spasmolytique qui, introduite 30 secondes avant le contracturant dans la cuve, diminue de 40 à 60 p. 100 la contraction provoquée par ce dernier.

- Contracturant : Chlorhydrate d'Acetylcholine -

Des doses d'acétylcholine de l'ordre de 0,5 microgramme à 3 microgrammes sont capables de provoquer sur l'iléon ou le duodénum une contraction de 2 à 4 cm de hauteur sur le tracé du cylindre tournant (vitesse 7,5 à 15 mm/minutes.)

L'essai est répété plusieurs fois jusqu'à obtention pour une même dose d'une réponse identique. Trois lavages au tyrode tiédi et un repos de 5 minutes entre deux essais sont nécessaires au segment intestinal travaillé pour revenir à son tonus initial. Le spasmolytique à tester est alors introduit dans la cuve jaugée à une dose connue 30 secondes avant une nouvelle addition d'acétylcholine semblable à celle employée pour les témoins de contractions. On observe sur l'enregistrement le pourcentage d'inhibition.

Le sulfate d'atropine, qui soustrait la fibre lisse aux stimulations cholinergiques, est utilisé enfin comme substance de référence à des doses de l'ordre de 0,02 à 0,2-0,4g. pour le duodénum déterminant le semi-relachement souhaité.

A la fin de chaque expérience (produit en cours d'étude ou atropine) on refait le test banal de contraction pour obtenir des données sur la reversibilité des actions spasmolytiques ainsi que sur l'évolution spontanée des réponses du segment intestinal en cause.

- Contracturant : Chlorure de Baryum.

Faire agir des doses de chlorure de baryum de l'ordre de 1 à 2 milligrammes puis le spasmolytique de référence, chlorhydrate de papavérine relaxant de la musculature lisse, par un mécanisme assez mal élucidé, à des doses de 50 à 100μ g. pour le duodénum. On procède de la même manière avec le spasmolytique à essayer. Le protocole expérimental a été en tous points semblable à celui décrit à propos de l'acétylcholine. A préciser toutefois les lavages plus rapides et plus nombreux pour tenter de limiter la sensibilisation très grande du segment intestinal à ce poison musculaire que représente le chlorure de baryum.

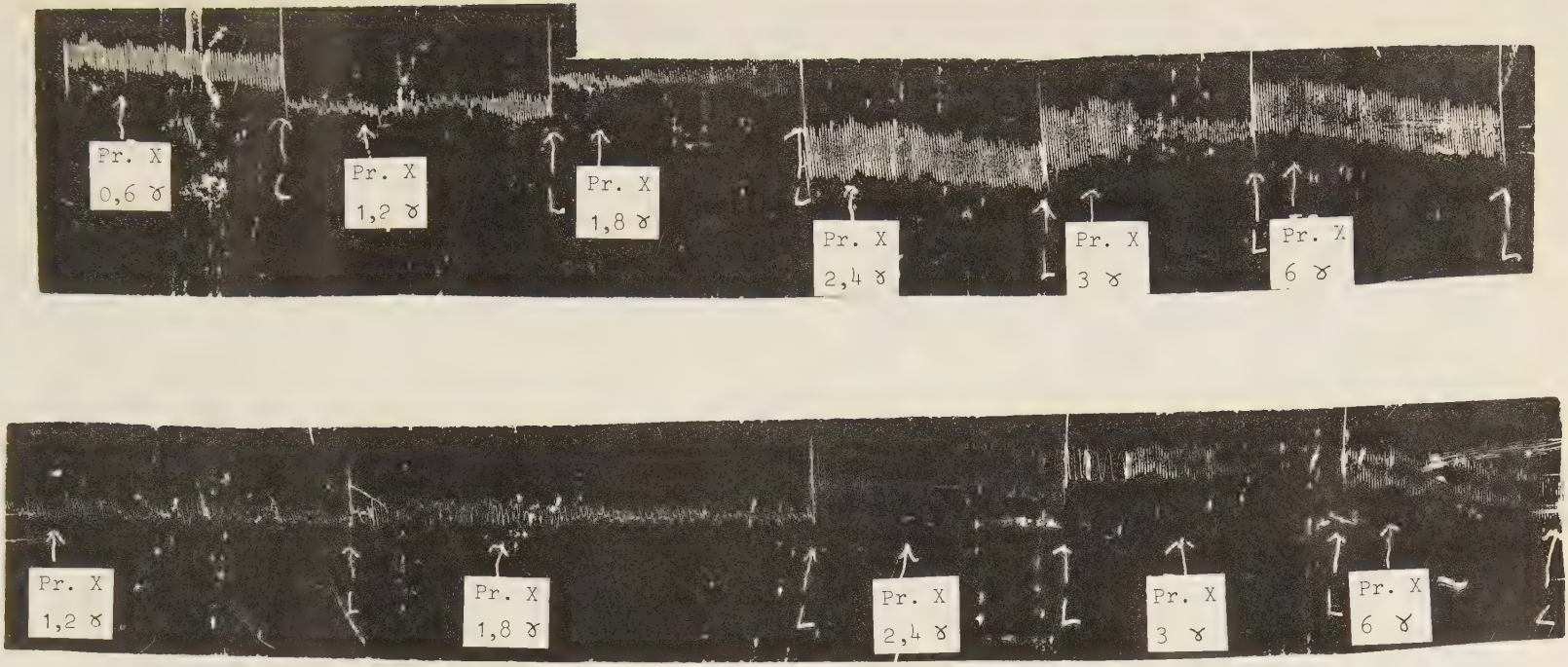
C - RESULTATS -

1 - Effet propre sur le duodénum isolé de rat

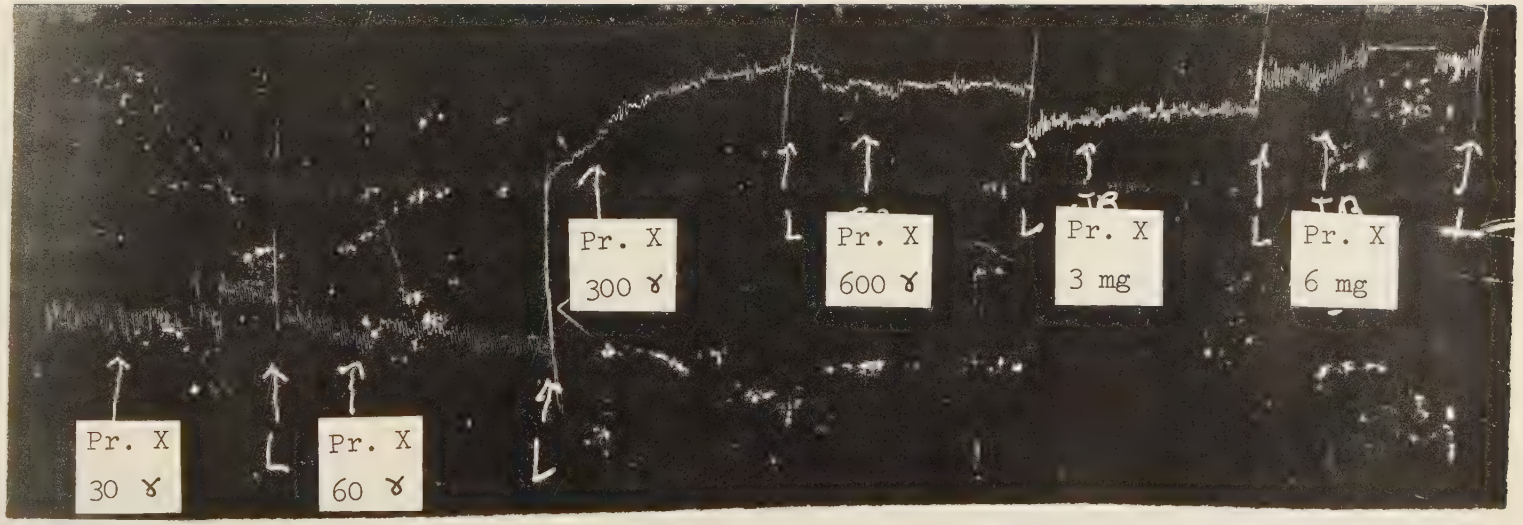
Le produit X a donné des effets très inconstants sur le duodénum isolé de rat; des doses croissantes paraissent inhiber le facisme de l'organe.

2 - Effet spasmolytique

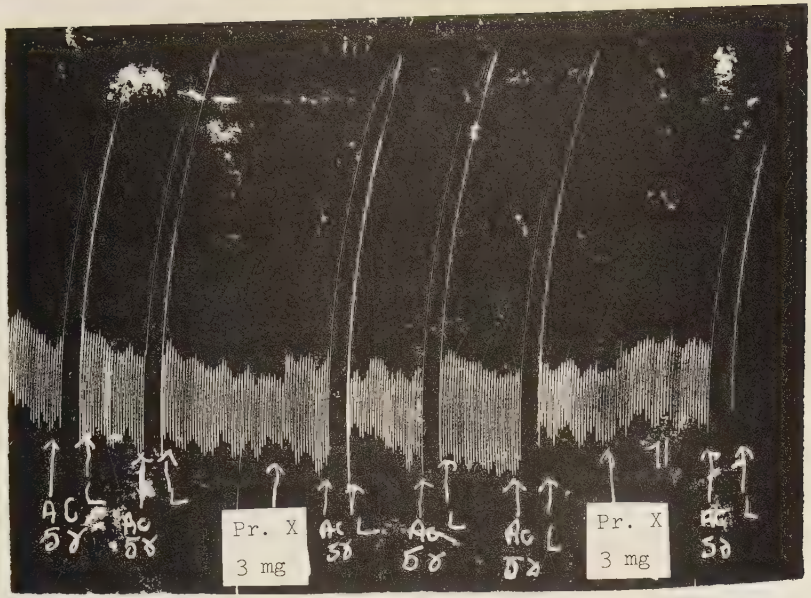
Le produit X à la dose de 3 mg. n'a entraîné aucune modification du spasme déclenché par l'acétylcholine et n'a pratiquement pas modifié le spasme déclenché par le chlorure de baryum.



PRODUIT X : EFFET PROPRE.



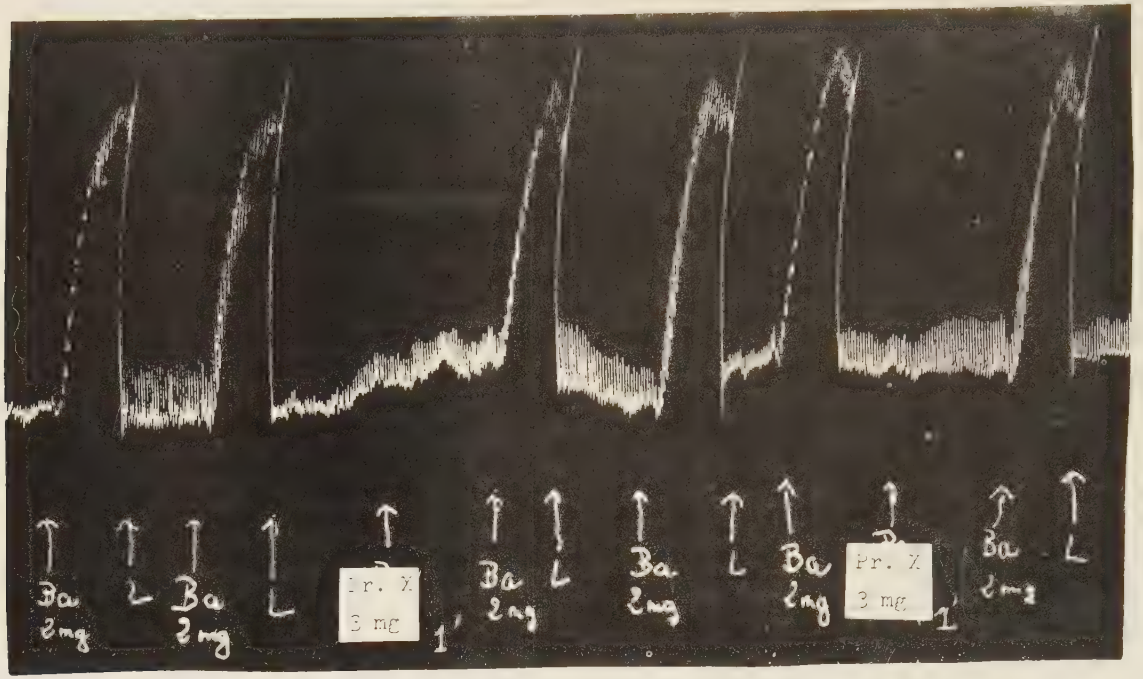
PRODUIT X : EFFET PROPRE A DOSES CROISSANTES.



PRODUIT X : EFFET VIS-A-VIS DE L'ACECOLINE

Ac 0,5 / 0,5 cm3

Pr. 3 mg/0,5 cm3



PRODUIT X : EFFET VIS-A-VIS DU SPASME DECLENCHE PAR LE CHLORURE DE BARYUM

CHAPITRE IV

ACTIVITE PARASYMPATHOLYTIQUE

Test de la chromodacryorrhée

Lacrymation pigmentée chez le rat éveillé.

A - PRINCIPE

Après injection d'acétyl β méthylcholine, un rat, animal de choix, présente une lacrymation rouge brunâtre (en moins d'une minute). En approchant une bande de papier filtre du sac conjonctival de l'animal, on recueille une goutte de sécrétion très pigmentée, facile à déceler. Lorsque l'effet est intense, le phénomène apparaît également vers les naseaux. La sécrétion se poursuit normalement 4 à 6 minutes. L'administration préalable d'un anticholinestérasique prolonge la lacrymation tandis que celle d'un parasympatholytique atténue ou inhibe ce phénomène rapide et fugace, toujours renouvelable au bout de quinze minutes. (40) (236).

B - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1 - Choix des animaux

Le test a été pratiqué sur des rats femelles de même âge, race Wistar, d'un poids de 200 grammes.

2 - Conditions expérimentales

Injecter la veille de l'expérience à chaque animal, 0,250 mg. β par 100 g. de poids corporel, d'acétyl métylcholine, ester acétylcholinique beaucoup plus stable que l'acétylcholine elle-même afin de vérifier la réponse lacrymale des animaux choisis. Le lendemain renouveler l'injection intrapéritonéale d'acétyl β méthylcholine à la même dose. L'épreuve est toujours à effectuer sur des animaux ayant reçu préalablement la substance à essayer ou le parasympatholytique de référence, l'atropine par exemple.

Au temps zéro : injection en intrapéritonéale du parasympatholytique à étudier ou d'atropine puis aux temps trois minutes, quinze, quarante-cinq et soixante-quinze minutes, injections renouvelées d'acétyl β méthylcholine.

Une demi-minute après l'injection de la subs - tance cholinergique on cherche à mettre en évidence la lacrymation par absorption sur papier filtre, ou trois minutes plus tard si la sécrétion est négative au début.

Si le phénomène n'est pas apparu au bout de trois minutes, sa venue est considérée comme improbable et la protection entière.

C - RESULTATS

Avec le produit X il faut atteindre la dose considérable de 150 mg. par 5 g. qui est sensiblement une dose sub-léthale pour obtenir la protection totale vis-à-vis de la chromodacryorrhée, mais cette protection n'est atteinte qu'après un temps de latence de 45 minutes, le produit X étant administré par voie I. P. sous forme de solution à 10 p. 100.

CHAPITRE V

ETUDE DES EFFETS VASOMOTEURS PAR PERFUSION DES VAISSEAUX DE L'OREILLE DU LAPIN

A - PRINCIPE -

L'artère centrale de l'oreille isolée du lapin est perfusée à l'aide d'un soluté physiologique chloruré sodique, auquel on additionne à intervalles de temps réguliers, de l'adrénaline et les produits à tester.

L'effet vasoconstricteur est mesuré par le nombre de gouttes de perfusat qui est enregistré avant et après administration des médicaments. (188).

B - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1 - Choix des animaux :

Utiliser des lapins fauves de Bourgogne d'âge 6 à 8 mois et de poids inférieur à 4 kg.

2 - Matériels :

a) - Appareils

- Un kymographe avec tambour enregistreur et papier enduit de noir de fumée.
- Un système de capsules de Marey permettant d'enregistrer le débit du liquide physiologique effluent.
- Une planchette en bois, paraffinée.

b) - Instruments

- Canules auriculaires en polyéthylène
- Réservoirs de soluté physiologique
- Seringues de 1 cm3

3 - Solutions et réactifs :

- Solution d'adrénaline allant de 0,05 μg.à 0,5 μ g. par cm3.
- Solution de noradrénaline allant de 0,1 à 1 μg. par cm3.
- Soluté physiologique de Page et Green répondant à la formule suivante (g. par litre) :

Chlorure de sodium	8,200 g.
Chlorure de potassium	0,840 g.
Chlorure de calcium	0,040 g.
Chlorure de magnésium	0,060 g.
Bicarbonate de sodium	0,400 g.
Glucose	1,000 g.

A chaque litre de la solution mère ci-dessus, on rajoute 10 cm3 du mélange :

- 4 volumes de solution molaire de phosphate dipotassique (à 17,4%).
- 1 volume de solution molaire de phosphate monopotassique (à 13,6 %).
- Solution de la substance présumée vasoconstrictrice, à tester, à doses physiologiques.

4 - Conditions expérimentales générales

a) - Préparation de l'oreille du lapin

Tuer le lapin en lui assénant un coup derrière la tête. Le saigner. Prélever les deux oreilles, le plus bas possible, au niveau de la partie fibro-cartilagineuse du pavillon, à l'aide d'un scalpel. Repérer l'artère auriculaire centrale située près de la partie fibro-cartilagineuse interne du pavillon. Ligaturer l'extrémité de cette artère au moyen d'un

fil fin. Disséquer cette artère sur 1 cm. et l'inciser pour introduitre la canule en polyéthylène. La canule mise en position doit être ligaturée avec l'artère au moyen d'un fil. Introduire immédiatement une certaine quantité de soluté physiologique (10 cm3 environ) dans l'artère au moyen d'une seringue. Fixer ensuite l'oreille sur la planchette inclinée, au moyen d'un ruban adhésif. Aboucher ensuite la canule en polyéthylène au tube relié au réservoir de soluté physiologique de perfusion. Laisser le liquide de perfusion s'écouler à un rythme de 60-70 gouttes par minute pendant une demi-heure, puis régler la vitesse de perfusion à 50 gouttes par minute environ. Chaque goutte de perfusat tombe sur une palette reliée à un système de capsules de Marey. Ainsi à chaque goutte, s'inscrit une encoche au niveau du cylindre enregistreur.

b) - Injection des substances vasoconstrictrices

La sensibilité de la préparation doit être maintenue constante à l'aide d'injections régulières d'adrénaline. Toutes les injections d'adrénaline ou des substances à tester sont faites lentement, à intervalles de temps réguliers, toutes les 5 minutes par exemple, à volume constant (1 cm3), à travers le bouchon de caoutchouc d'un petit tube de verre placé à l'arrivée du liquide de perfusion dans l'artère. Vérifier que des injections témoins faites à l'aide du soluté physiologique lui-même ne modifient pas le débit du perfusat.

Les doses injectées sont fonction de l'activité des substances à tester.

Dans le cas de l'adrénaline : injecter 0,05 à 0,5 μg./cm3.

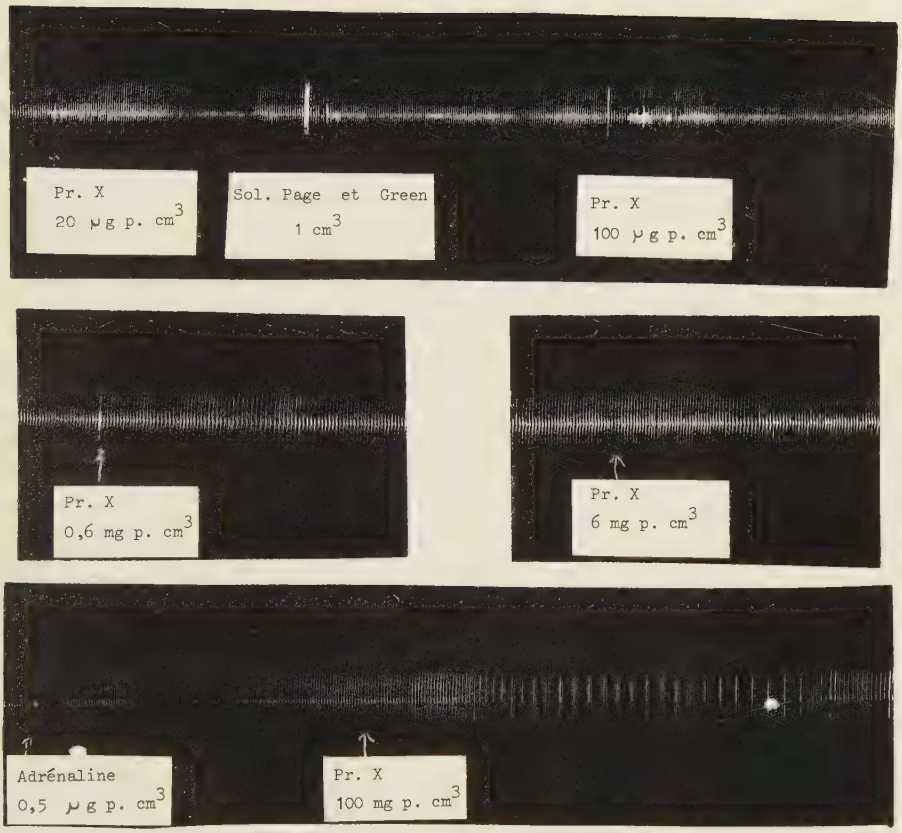
Dans le cas de la noradrénaline : injecter 0,1 à 1 μg./cm3.

c) - Résultats

Après injection de substances vasoconstrictrices, il y a diminution du débit, diminution que l'on repère sur le cylindre par un plus grand écart entre 2 traits. Cette méthode est surtout qualitative.

C - RESULTATS -

Le produit X ne présente pas d'effets vasoconstricteurs aux doses de 20 μg. 100 μg., 0,6 mg. et 6 mg./cm3. Il faut atteindre la dose de 100 mg./cm3 pour avoir un effet vasoconstricteur très net, supérieur à celui de l'adrénaline à la dose de 0,5 μg./cm3, mais cet effet est d'origine toxique vu la dose considérable administrée.



OREILLE ISOLEE DE LAPIN : EFFET DU PRODUIT X

CHAPITRE VI

EFFETS SUR LA TENSION ARTERIELLE CHEZ LE LAPIN

A - PROTOCOLE EXPERIMENTAL (83)

1 - Choix des animaux

Utiliser le lapin (sexe et race indifférents) d'âge 6 à 8 mois et de poids inférieur à 4 kg.

2 - Choix du matériel

a) - Appareils
- Un kymographe avec tambour enregistreur et papier enduit au noir de fumée.
- Une table de contention avec chauffage thermostatique de préférence.
- Un manomètre à mercure de Ludwig.
- Une pompe à respiration artificielle

b) - Solutions et réactifs
- Une solution d'uréthanne à 50 p. 100
- Une solution anti-coagulante : Na_2SO_4 100 g.
  $Mg.SO_4$ 100 g.
  Eau distillée q. s. p. 1 l.
- Une solution aqueuse d'héparine à 3 %
- Des solutions de médiateurs qui seront par exemple :
  - l'adrénaline (4-5 μg./kg.)
  - L'acétylcholine (5-10 μg./kg)

c) - Instruments
- Une canule de Jolyet ou de Franck
- Pinces hémostatiques
- Pinces de Mohr
- Seringues 20 cm3, 2 cm3
- Fil à suture
- Tubes caoutchouc et plastique.

3 - Conditions expérimentales générales

a) - Anesthésie de l'animal

b) - Réglage du manomètre

A l'aide d'une seringue de 20 cm3, introduire dans le tube de caoutchouc du manomètre la quantité de liquide anticoagulant nécessaire à purger l'appareil de l'air contenu dans les tuyaux ; les deux robinets étant ouverts, le liquide anticoagulant s'écoule alors par l'ajustage latéral du manomètre relié au robinet supérieur ; dès le début de l'écoulement, fermer ce robinet. Continuer à introduire du liquide anticoagulant pour créer une dépression de 8 à 10 cm. de mercure entre les 2 branches du tube en U du manomètre. Fermer le robinet inférieur. Ainsi se trouve créée une montée de mercure équivalente à l'élément constant de la pression artérielle.

c) - Préparation de l'animal

Préparation de la veine saphène

Epiler la région du tiers moyen externe de la cuisse. S'assurer en palpant avec le doigt de la position exacte de la veine saphène. Isoler cette veine sur 1,5 cm. Ligaturer le bout distal de la partie isolée et introduire une canule physiologique 8/10e : l'injection de composés à étudier se fera au moyen de cette canule.

Trachéotomie et respiration artificielle

Lorsque le lapin est bien attaché, débarrassé des poils de la région antérieure du cou, inciser la peau au niveau de la ligne médiane, sur une longueur de 6 à 7 cm. Dénuder la trachée au moyen de pinces et d'une sonde cannelée. Sous la couche graisseuse superficielle apparaît le plan musculaire formé des muscles sternohyoïdiens et sterno-thyroïdiens médians, et des muscles sterno-mastoïdiens latéraux. Au centre de ce dernier plan musculaire, se trouve

la trachée. Plus bas que le larynx, pratiquer une incision en V. Choisir une canule en rapport avec le diamètre de la trachée. Introduire une canule trachéale en fer ou en verre. Fixer la canule dans la trachée par deux ligatures. Relier la canule à la pompe à respiration artificielle de Braun dont le rythme dépend de la vitesse du moteur et le volume d'air administré est fonction de la place du piston. Chez le lapin, le rythme est de 60 mouvements respiratoires par minute, le volume d'air voisin de 40-50 cm3.

- Mesure de la pression carotidienne.

De part et d'autre de la trachée se trouvent les paquets vasculo-nerveux qui contiennent les carotides. Il est nécessaire de dégager la carotide des nerfs (pneumogastrique, chaîne sympathique et nerf de Cyon) en prenant garde de ne pas les léser. Si la carotide possède une collatérale, la ligaturer. Sur son bout cardiaque est placée une pince hémostatique à 2 cm. de la première ligature. Inciser la carotide obliquement et y introduire la canule en direction du coeur. (canule préalablement héparinée). La canule mise en position doit être ligaturée avec la carotide à l'aide du fil placé auparavant. Il est nécessaire de remplir à nouveau d'héparine cette canule, pour éviter la formation d'un caillot. Relier la canule du tube contenant le liquide anti-coagulant, tube lui-même relié au manomètre à mercure. Pour mettre l'artère en communication avec le manomètre, enlever la pince hémostatique et ouvrir le robinet inférieur. L'enregistrement se fait à faible vitesse.

B - RESULTATS -

Par voie intraveineuse, le produit X, administré sous forme de solution à 10 p. 100 à la dose de 30 mg. p. kg., ne déclenche qu'une très légère action hypotensive bien inférieure à celle présentéepar l'acétylcholine à la dose de 10 μg. par kg. Il est à noter que le produit X administré avant cette dose d'acétylcholine prolonge en intensité et en durée cet effet hypotenseur. Par contre, le produit X n'a aucune action sur l'hypertension adrénalinique (4 μg. d'adrénaline par kg.)

CHAPITRE VII

ANESTHESIE LOCALE DE SURFACE

TEST DE REGNIER -

A - PRINCIPE -

Une seule excitation de la cornée d'un oeil normal, produite par un crin fin, fait apparaître une réaction de cet oeil sous la forme du réflexe oculo-palpébral. Un oeil anesthésié ne réagit plus à cette excitation unique.

Le nombre d'excitations nécessaire pour provoquer le reflexe est proportionnel à la puissance d'action de l'anesthésique (127) (177) (178).

B - PROTOCOLE EXPERIMENTAL -

1 - Choix des animaux

On utilise des lapins fauves de Bourgogne. La veille de l'expérimentation, les lapins à tester sont amenés dans le local d'expérience. Les cils et tous les poils situés aux alentours de l'oeil sont soigneusement coupés au ciseau courbe pour éviter le réflexe de Wernicke. Pendant les 12 heures précédant l'expérience, les animaux sont laissés sans nourriture.

Pour le test, le lapin est placé dans une boîte en bois, avec seulement la tête qui dépasse. L'éclairage de la pièce est constant (lumière du jour) et la température

ambiante est notée. Les bruits sont à éviter au maximum pendant le test.

2 - Choix du matériel

Les stimulations sont effectuées à l'esthésiomètre de COCHET et BONNET. Après plusieurs mises au point, nous avons déterminé la longueur de son fil de nylon (diamètre 12/100 de mm) à 10 mm, ce qui équivaut à une pression moyenne de 145 mg.

3 - Conditions expérimentales générales

Les essais sont pratiqués comme suit :

- Au temps -2 minutes, on vérifie qu'un seul attouchement du fil de nylon sur la cornée détermine l'occlusion immédiate des paupières.

- Au temps -0 minute, la solution anesthésique choisie est instillée dans le cul de sac conjonctival de façon à ce que ce dernier soit rempli.

La solution est laissée exactement 2 minutes au contact de la cornée. A la fin des 2 minutes, la paupière inférieure est relâchée. L'anesthésique s'écoule et le pourtour de l'eil est essuyé doucement avec un coton.

Au temps + 3 minutes, on effectue une première série d'excitations sur la cornée avec l'esthésiomètre. Elle consiste à toucher la cornée toujours au même endroit, à raison de 4 excitations/sec. environ, le fil de nylon restant parfaitement perpendiculaire au plan cornéen (le nombre d'excitations nécessaires pour obtenir l'occlusion palpébrale est noté.)

Aux temps + 6 minutes, + 10 minutes, renouveler le test, Procéder de même toutes les 5 minutes et renouveler cette série d'excitations jusqu'à ce qu'une seule déclenche le réflexe cornéen (indice de reprise de la sensibilité cornéenne.)

Les lapins sont laissés une semaine au repos et des essais croisés des 2 produits testés sont refaits dans les conditions décrites précédemment.

Remarque - Il ne faut, à chaque série, effectuer que 200 excitations consécutives, même si le réflexe n'est pas obtenu, ceci afin de laisser l'oeil se reposer entre chaque série. On notre alors >200 (cf. LECHAT, thèse Médecine, Paris, 1956).

C - RESULTATS -

Le produit X en solution à 10 p. 100 n'a présenté aucune activité anesthésique locale sur l'oeil de lapin.

CHAPITRE VIII

EFFET VIS-A-VIS DE L'ACTION CONTRACTURANTE DE L'ACETYLCHOLINE SUR LA MUSCULATURE DORSALE DE LA SANGSUE

Nous nous sommes inspirés de la technique décrite par DASTUGUE (51) pour l'utilisation de la musculature dorsale énervée de sangsue, appliquée au dosage biologique de l'acétylcholine.

A - PREPARATION DU MUSCLE -

La sangsue est placée sur sa face dorsale et fixée sur une planchette à dissection en liège. Deux incisions longitudinales partant des commissures labiales partagent la sangsue en deux parties, ventrale et dorsale. On élimine à l'aide d'un scalpel la partie ventrale, les viscères et la chaîne nerveuse. On découpe alors un fragment de deux centimètres de long environ, assez loin de la partie buccale qui renferme les ganglions cérébroïdes.

B - DECONTRACTION -

Pendant 60 à 90 minutes le muscle est immergé dans une solution de Ringer dont la composition est la suivante :

Ringer I	NaCl	125,4 g.
	KCl	3,08 g.
	Eau q. s. p.	1000 cm3
Ringer II	$CaCl_2$	3,12 g.
	Eau q. s. p.	1000 cm3
H_3PO_4 dilué	H_3PO_4 concentré	6,3 cm3
	Eau q. s. p.	1000 cm3

On mélange :

H_3PO_4 dilué	3 cm3
Ringer I	100 cm3
Ringer II	100 cm3

On ajoute du Na_2CO_3 cristallisé jusqu'à l'obtension d'un pH de 7,2.

On fait ensuite agir sur le muscle placé dans le bain de Ringer, un poids de 0,5 à 1 g. pendant 30 minutes. Le poids est ensuite enlevé et après une courte durée nécessaire à la stabilisation du muscle, la préparation est prête à l'expérimentation.

C - EXPERIMENTATION -

Le muscle est placé dans 25 cm3 d'une solution de Ringer convenablement aéré. Les contractions sont enregistrées à l'aide d'un levier amplificateur sur un cylindre.

La préparation est étalonnée avec une solution de chlorure d'acétylcholine à 1 p. 200 000 que l'on laisse agir trois minutes. Après trois lavages successifs d'une minute et après retour du muscle au tonus initial on ajoute la substance à étudier que l'on laisse agir 6 minutes. On ajoute alors l'acétylcholine et on enregistre la contraction pendant trois minutes.

Après trois autres lavages on procède à un deuxième étalonnage avec la même dose d'acétylcholine : celui-ci doit être identique au premier.

D - RESULTATS -

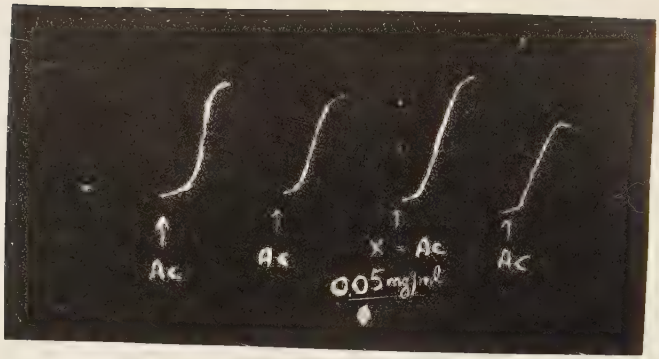
Le produit testé ne possède pas d'effet propre aux doses utilisées.

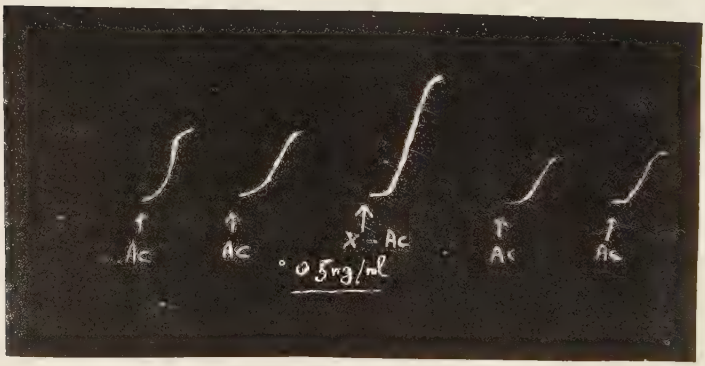
Pour des concentrations allant de 5.10^{-6} à 5.10^{-4} mg./cm3, il ne modifie pas l'effet contracturant de l'acétylcholine. On note ensuite, pour des concentrations plus élevées un effet potentialisateur très net qui peut être chiffré à :

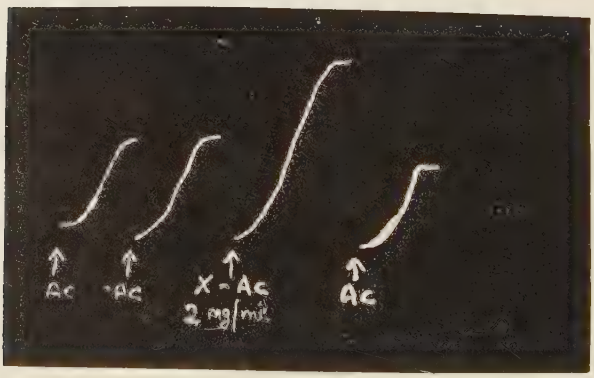
20 p. 100 pour une concentration de $5\ 10^{-2}$ mg/ cm3.

60 p. 100 pour une concentration de $5\ 10^{-1}$ mg/ cm3.

100 p. 100 pour une concentration de 2 mg/ cm3.







PRODUIT X : EFFET VIS-A-VIS DE L'ACTION CONTRACTURANTE DE L'ACETYLCHOLINE SUR LA MUSCULATURE DORSALE DE LA SANGSUE.

CONCLUSIONS GENERALES

Notre travail se présente comme une tentative pour apporter dans trois domaines une contribution à nos connaissances sur une famille de composés peu étudiés, les acides spirolactone carboxyliques.

Du point de vue chimique, nous avons sélectionné et repris deux modes de préparation faisant appel à la condensation de diesters avec un carbonyle cétonique ou aldéhydique. Nous avons utilisé comme matières premières des cyclanones et azacyclanones ce qui nous a permis d'accéder à deux séries voisines et complémentaires : les acides aconiques et paraconiques.

Par la méthode de Stobbe qui utilise le succinate de diéthyle à chaud en présence d'une base forte, le plus souvent le tert-butylate de potassium, nous avons obtenu en deux étapes les acides paraconiques dérivés de la cyclohéxanone et de la cyclododécanone et leurs esters.

Par la technique de Katsuta qui permet d'obtenir en une seule étape les acides aconiques en condensant l'itaconate de méthyle sur des cyclanones, à froid, en présence de méthylate de sodium dans l'éther anhydre, nous avons préparé des spirolactones carboxyliques insaturées et leurs

esters à partir de la cyclohexanone, de la cyclopentanone, de la méthyl - 1 pipéridone et la benzyl-1 pipéridone. Nous avons également obtenu les acides saturés correspondants par réduction avec l'amalgame de sodium.

Nous avons revu certains modes opératoires, isolé des produits intermédiaires qui ne l'avaient pas été jusque là, précisé certains mécanismes réactionnels. Treize composés ont été ainsi préparés et leur structure a été confirmé par microanalyse et spectrométrie infra-rouge. L'existence d'associations moléculaires a été discutée pour certains types de structure.

Du point de vue enzymologique, nos études ont été guidées par le souci de rechercher des relations entre certains éléments structuraux de nos molécules et la configuration de quelques enzymes. A cet effet nous avons sélectionné les acides spirolactone carboxyliques insaturés obtenus à partir de la cyclopentanone, de la cyclohexanone et de la méthyl-1 pipéridone par la technique de Katsuta. Nous avons pensé que ces produits pourraient agir par leur fonction lactone susceptible de jouer le rôle de groupement haptophore et d'échanger des liaisons hydrogène par son carbonyle. D'autre part le dernier composé est porteur d'un azote protoné qui peut être accepté par un site anionique. Nous avons exploré les activités lactate déshydrogénasique (1. 1. 1. 27) adénosine triphosphatasique (3. 6. 1. 3.) et cholinestérasiques (3. 1. 1. 7.) (3. 1. 1. 8.) Au vu de nos résultats, le carbonyle lactonique et éventuellement le carbonyle carboxylique semblent être impliqués à des degrés divers dans l'interaction avec les enzymes envisagées, mais le rôle de l'azote protoné paraît essentiel. En effet, le composé azoté se montre toujours plus actif que les deux autres produits testés et inverse même l'action dans le cas de la lactate déshydrogénase.

Nous avons tenté d'expliquer nos résultats en fonction de l'interférence possible de nos produits avec divers groupements essentiels à l'activité enzymatique, qu'ils fassent partie du coenzyme ou du site actif de l'enzyme.

Les essais pharmacologiques limités à une seule molécule ont été dans l'ensemble plus décevants. Peu toxique, le composé azoté retenu pour cette étude ne se montre actif qu'à des doses élevées dans les différents tests pratiqués. S'il inhibe le péristaltisme de l'iléon isolé de cobaye,

ses effets parasympathomimétiques, s'exercent de façon inconstante. S'il prolonge l'action de l'acétylcholine sur la tension artérielle, il ne s'oppose pas aux effets de l'adrénaline.

Il présente par contre un effet potentialisateur très net vis-à-vis de l'action contracturante de l'acétylcholine sur la musculature dorsale de la sangsue.

Malgré ces premiers résultats, nous pensons qu'il est nécessaire d'entreprendre des essais plus détaillés et de les étendre à d'autres composés de cette même série avant de tirer des conclusions définitives.

Nous nous permettrons d'écrire en terminant que les systèmes enzymatiques constituent un matériel de choix pour l'expérimentation moléculaire que nous avons tenté de réaliser dans ce modeste travail. Aussi comptons-nous poursuivre nos investigations dans ce domaine en nous attachant plus spécialement à étudier les interactions des composés d'intérêt biologique au niveau des coenzymes et de la surface active des enzymes.

Vu, Clermont-Ferrand le 16 Mars 1970

Clermont-Ferrand le 16 Mars 1970

Le Président du Jury

G. MEYNIEL

Vu et Permis d'Imprimer
N° Ph 2/70

Clermont-Ferrand, le 16 Mars 1970

Le Doyen de la Faculté mixte de
Médecine et de Pharmacie

G. MEYNIEL

BIBLIOGRAPHIE

1 - ALBERS R. W. - Ann. Rev. Biochem., 1967, 36, p. 727.

2 - ANDERSON B. M., KAPLAN N. O. - J. Biol. Chem., 1959, 234, p. 1726.

3 - ANDRAUD G., COUQUELET J., DOREL M., TRONCHE P. - C. R. Soc. Biol., 1966, 160, p. 325.

4 - ANDRAUD G., COUQUELET J., TRONCHE P., DOREL M. - Ann. Biol. Clin., 1966, 24, p. 469.

5 - ANKER R. M., COOK A. H. - J. Chem. Soc., 1948, 1, p. 806.

6 - ARCHER S., LANDS A. M., LEWIS T. R. - J. med. pharm. chem., 1962, 5, 423.

7 - AUGUSTINSSON K. B. - The Enzymes, Academic Press New-York and London, 1960, 4, p. 521.

8 - AUGUSTINSSON K. B., NACHMANSOHN D. - Traité de Biochimie générale, 1964, 2, p. 408.

9 - AVENA R. M., BOWEN W. J. - J. Biol. Chem., 1969, 244, p. 1600.

10 - BAER H. - J. Biol. Chem., 1946, 162, p. 65.

11 - BAILEV K., PERRY S. V. - Biochem. Biophys. Acta, 1947, 1, p. 506.

12 - BAN T., TAKAORI S., SASA M., SHIMAMOTO K. - Jap. J. Pharmacol., 1967, 17, p. 30.

13 - BARMAN T. E. - Enzyme Handbook, Springer-Verlag Ed. Berlin, 1969, 2, p. 515.

14 - BASTIDE P., BAUDON J., DASTUGUE G., REBIERE J. P. - Ann. Biol. Clin., 1960, 18, p. 307.

15 - BASTIDE P., COUQUELET Joêle, COUQUELET Jacques C. R. Soc. Biol., 1969, 166, p. 1149.

16 - BASTIDE P., PAYARD M., BOYER J. B., COUQUELET J. - C. R. Soc. Biol., 1969, 163, p. 400.

17 - BASTIDE P., TRONCHE P., PAYARD M., BOYER J. B. - C. R. Soc. Biol., 1969, 163, p. 1149.

18 - BEHBEHANI A. M., Mac MILLEN J. K., HILLER M. S., WENNER H. A. - Appl. Microb., 1967, 15, p. 940.

19 - BELLAMY L. J. - The infrared spectra of complex molecules, Methuen and Co Ltd. London, 1964.

20 - BELLEAU B. - Ann. N. Y. Acad. Sci., 1967, 144, p. 705.

21 - BENDA P., DESHAIES G., PERLES R., DESHAIES-PERLES S. - Ann. Med. Fr., 1960, 2, p. 770.

22 - BENDA P., PERLES R. - C. R. Acad. Sci. Paris, 1960, 251, p. 1312.

23 - BERGMANN F., WILSON I. B., NACHMANSOHN D. - J. Biol. Chem., 1950, 186, p. 693.

24 - BILLET D. - Bull. Soc. Chim. Fr., 1949, 16, p. 297.

25 - BISAGNI E., MARQUET J. P., LOUISFERT J. A. - Bull. Soc. Chim. Fr., 1968, p. 637.

26 - BLANC J., GASTAMBIDE B. - Bull. Soc. Chim. Fr., 1962, p. 2055.

27 - BLUM J. J., SANADI D. R. - J. Biol. Chem., 1964, 239, p. 452.

28 - BLUM J. J., SANADI D. R. - J. Biol. Chem., 1964, 239, p. 455.

29 - BOAS F., STENDE R. - Biochem. Z., 1935, 279, p. 417.

30 - Brevet Français n° 1 494 204, Hommel Aktiengesellschaft, 1967.

31 - BOBRANSKI B., SEDZIMIRSKA B. - Arch. Immunol. Ther. Exp., 1967, 15, p. 435.

32 - BROCHMANN-HANSSEN E., SCHMID P., BENMAMAN J. D. - J. Pharm. Sci., 1965, 54, p. 783.

33 - BROWNLEE R. G., SILVERSTEIN R. M., MULLER-SCHWARZE D., SINGER A. G. - Nature, 1969, 221, p. 284.

34 - B.S.M. Clin Byla n°3 925 M, 1966.

35 - B.S.M. Etat français n°7 463 M, 1968.

36 - B.S.M. Jacques Logeais, n°6 704, 1967.

37 - B.S.M. Roussel U C L A F, n°5 422, 1967.

38 - B.S.M. Sandoz S.A., n°5 151 M, 1965.

39 - B.S.M. Searle and Co, n°7 120 M, 1965.

40 - BURGEN A.V. - J. of Pharm., 1949, 4, p. 185.

41 - CABAUD P.G., WROBLEWSKI F. - Ann. J. Clin. Pathol., 1958, 30, p. 234.

42 - CIER A., RIOTTE M., JOUVET M., SCHMITT M., DUCA P. - C.R. Soc. Biol., 1966, 160, p. 126.

43 - COHEN Y. - Principe de l'utilisation des organes isolés en pharmacodynamie, Conf. J. pharm. Fr., 1956.

44 - COLBURN N.H., BOUTWELL R.K. - Cancer Research, 1966, 26, p. 1701.

45 - COOPER C. - J. Biol. Chem., 1960, 235, p. 1815.

46 - CORDONNIER D. - Vie médicale, 1964, 45, p. 127.

47 - COUQUELET J. - Thèse de Doctorat en pharmacie d'Etat, Clermont-Ferrand, mars 1967.

48 - COUQUELET Joêle, COUQUELET Jacques, LE POLLES J.B., TRONCHE P. - Chimie thérapeutique, 1969, 4, sous presse.

49 - CRANE R.K., LIPMANN F. - J. Biol. Chem., 1953, 201, p. 235.

50 - DALLACKER F., PAULING M., LIPP M. - Ann., 1963, 663, p. 58.

51 - DASTUGUE G. - Thèse de Doctorat ES-Sciences, Diplôme d'Etat, Lyon, 1940.

52 - DASTUGUE G., BAUDON J., BASTIDE P., REBIERE J.P. - Trav. Soc. Pharm. Montpellier, 1960, 20, p. 249.

53 - DAWSON F.W., JANSSEN R.F., HOFFMAN R.K. - Appl. Microb., 1960, 8, p. 39.

54 - DELAYE J., LOIRE R., DELAHAYE J.P., PERRIN A. Cah. Med. lyonnais, 1967, 43, p. 10.

55 - DICKENS F. - Brit. Med. Bull., 1964, 20, p. 96.

56 - DICKENS F., JONES H. E. H. - Brit. J. Cancer, 1964, 17, p. 691.

57 - DICKENS F., JONES H. E. H. - Brit. J. Cancer, 1965, 19, p. 392.

58 - DICKENS F., JONES H. E. H., WAINFORTH H. B. - Brit. J. Cancer, 1966, 20, p. 134.

59 - DIXON S., WIGGINS L. F. - J. Chem. Soc., 1954, p. 594.

60 - DOEPP W., BERSCH H. W. - Die Pharm., 1950, 5, p. 603.

61 - DULOU R., VILKAS M., PFAU M. - Compt. rend., 1959, 249, p. 429.

62 - DUQUENOIS P., GREIB E. - C. R. Acad. Sci. Paris, 1953, 237, p. 1354.

63 - ELKIK E. - Journal de Recherches du C. N. R. S., Lab. Bellevue (Paris), 1958, 40, p. 176.

64 - ELLIOT M. - J. Chem. Soc., 1956, p. 2231.

65 - ELODI P. - Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 1958, 13, p. 213.

66 - EVANS D. J. Jr. - J. bacteriol., 1969, 100, p. 914.

67 - FALBE J., HUPPES N., KORTE F. - Ber., 1964, 97, p. 863.

68 - FEDORCHUK M. - Dissert. Abst., 1962, 22, p. 3418.

69 - FIESER F., FIESER M. - Advanced organic chemistry, Reinhold Publishing Corporation, Chapman and Hall Ltd. London, 1961, p. 594.

70 - FISHBEIN W. N., BESSMAN S. P. - J. Biol. Chem., 1966, 241, p. 4835.

71 - FISHBEIN W. N., BESSMAN S. P. - J. Biol. Chem., 1966, 241, p. 4842.

72 - FISHBEIN L., FALK H. L. - Chromatographic Reviews, 1969, 11, p. 415.

73 - FITCH W. M. - Biochemistry, 1963, 2, p. 1221.

74 - FITTIG R. - Ann., 1904, 331, p. 151.

75 - FITTIG R., BOCK K. - Ann., 1904, 331, p. 174.

76 - GASTAMBIDE B. - Compt. rend., 1955, 241, p. 702.

77 - GASTAMBIDE B., GASTAMBIDE M. - Bull. Soc. Chim. Fr, 1956, p. 1203.

78 - GASTAMBIDE B., GASTAMBIDE M. - Fr. 1 121 528, 1956.

79 - GASTAMBIDE-ODIER M., CARNERO P., CHEVALLIER J., GASTAMBIDE B., LAROCHE J. M., COTTARD A. Bull. Soc. Chim. Fr., 1963, p.1777.

80 - GAULT H. - Fr. 898 946, 1945.

81 - GAULT H., GORDON-FISCHHOF G., ONNO R. - Chimie et Industrie, 1952, 68, p. 200.

82 - GAULT H., SUQUET M. - Compt. rend., 1951, 233, p. 180.

83 - GAUTRELET J. - Eléments techniques de Physiologie, Masson Ed. Paris, 1932, p. 255.

84 - GEISSMANN T. A. - Principes de chimie organique, traduction française, Dunod Ed. Paris, 1965, p. 479.

85 - GEREBTZOFF M A. - Cholinestérases, Pergamon Press London, 1959.

86 - GHILARDI G., GAULT H. - Compt. rend., 1952, 234, p. 337.

87 - GIARMAN N. J., ROTH R. H. - Science , 1964, 145, p. 583.

88 - GIBSON D. M., DAVISSON E. G., BACHKAWAT B. K., RAY B. R., VESTLING C. S. - J. Biol. Chem., 1953, 203, p. 397.

89 - GIROUD J. P., SCHMITT H. - Thérapie, 1968, 23, p. 307.

90 - GLYNN I. M. - Pharmacol. Rev., 1964 , 16.

91 - GORDON E., GAULT H., LALOI L. - Coll. Intern. C. N. R. S. Paris, 1954, 56, p. 90.

92 - GORDON E., GAULT H., LALOI L. - Bull. Soc. Chim . Fr., 1955, p. 293.

93 - GORDON E., ONNO R., GAULT H. - Compt. rend., 1959, 249, p. 2332.

94 - GRAM D. J., HAMMOND G. S. - Chimie organique, Presses Universitaires Laval, Québec, 1963, p. 74.

95 - GRIGNARD V., DUPONT G., LOCQUIN R. - Traité de Chimie organique, Masson Ed. Paris, 1945, 11, p. 78.

96 - GRUMBACH A., SCHMIDT H., BENEZE W. - Experientia Basel, 1952, 8, p. 224.

97 - HAMPEL H., HAPKE H. J. - Arch. Int. pharmacodyn., 1968, 171, p. 306.

98 - HANO J. - Conférence Fac. Pharm. Montpellier, 5 novembre 1968.

99 - HANO J., SIEROSLWSKA H., SYPNIEWSKA M., CZARNECKI R. - Dissert. Pharm. Pharmacol., 1967, 19, p. 321.

100 - HARPER S. H., REED H. W. B. - J. Chem. Soc., 1955, p. 779.

101 - HAYNES L. J. - Quart. Rev. Chem. Soc. London, 1948, 2, p. 46.

102 - HAZARD J., KLEINKNECHT D. - Thérapie, 1967, 22, p. 9.

103 - HEILBRON - Dictionary of Organic compounds, Eire and Spottishwood Publishers Ltd., E and F N Ltd., 1965.

104 - HEITARO O. - J. Chem. Soc. Jap., Pure Chem. Sect., 1954, 75, p. 1095.

105 - HO-DAC-AN, BUU-HOI N. P. - Thérapie, 1969, 24, p. 627.

106 - HOSEKI S., KOTAVE M., HAYASI K. - Cités par Lebeau P. et Janot M. M., Traité de Pharmacie chimique, Masson Ed. Paris, 1955-56, p. 1155.

107 - ITO et coll. - Cités par Lebeau P. et Janot M. M., Traité de Pharmacie chimique, Masson Ed. Paris, 1955-56, p. 944.

108 - JEFFERY D., FRY A. - J. Org. Chem., 1957, 22, p. 735.

109 - JOHNSON W. S., DAUB G. M. - Organic reactions, John Wiley and sons Ed. New-YorK, 1951, 6, p. 27.

110 - JOHNSON W. S., DAVIS C. E., HUNT R. H., STORK G. J. Am. Chem. Soc., 1948, 70, p. 3021.

111 - JOHNSON W. S., JOHNSON H. C. E., PETERSEN J. W. J. Am. Chem. Soc., 1945, 67, p. 1360.

112 - JOHNSON W.S., PETERSEN J.W., SCHNEIDER W.P. J.Am. Chem. Soc., 1947, 69, p.74.

113 - KAGAWA Y., RACKER E. - J.Biol. Chem., 1966, 241, p.2461.

114 - KATO M., HAYASHI Y., MIWA T., SAKAN T. - Nippon Kogaku Zasshi, 1964, 85, p.223.

115 - KATSUTA C., SUGIYAMA N. - Bull. Chem. Soc. Jap. 1962, 35, p. 1194.

116 - KAWAMOTO T., OGURA I. - J.Chem. Soc. Jap., Pure Chem. Sect., 1951, 72, p.743.

117 - KAWAMOTO T., OGURA I. - J. Chem.Soc. Jap., Pure Chem. Sect., 1952, 73, p.726.

118 - KENDALL D.N. - Applied infrared spectroscopy, Reinhold Publishing Corporation., Chapman and Hall ltd. London, 1966.

119 - KIELLEY W.W. - The Enzymes, Academic Press, New-York and London, 1961, 5, p.149 et 159.

120 - KUBOWITZ F., OTT P.- Biochem. Z., 1943, 314, p.94.

121 - KLOTZER W., BRETSCHEIDER H. - Monatsh, 1956, 87, p. 332.

122 - KUBO S., TOKURA S., TONOMURA Y. - J.Biol. Chem., 1960, 235, p.2835.

123 - KUNIKALSU S., TADAHIRO K., YOSHIO K., NOBUO A. Tetrahedron, 1969, 25, p.3179.

124 - LACASSAGNE A., BUU-HOI N.P., ZAJDELA F., JACQUIGMON P., MANGANE M., Science , 1967, 158 p.387.

125 - LADD E.C., PAXTON H.W. - U.S. patent n°2.598.803, 1952.

126 - LATNER A.L., SKILLEN A.W. - Isoenzymes in Biology and Medecine, Academic Press, London and New-York, 1968.

127 - LECHAT P. - Bases et conditions expérimentales de l'essai des anesthésiques locaux sur la cornée, Thèse de Doctorat en Médecine, Paris, 1956.

128 - LEFEBVRE Y., FERLAND J.M. - U.S. patent n° 3.431.258, American Home Products Corp., 1967.

129 - LEFEBVRE Y., FERLAND J. M. - U. S. patent, n° 3. 436. 390, American Home Products Corp., 1967.

130 - LEHNINGER A. - Bioénergétique, Ediscience, Paris, 1969.

131 - LIPP M., DALLACKER F., PAULING H. - Ann. ,1961, 644, p. 37.

132 - LITTLE JE., JOHNSTONE D. B. - Arch. Biochem., 1951, 30, p. 445.

133 - MAATSCHAPPY N. V., Shell International Research, Brevet français n° 1. 319. 239, 1963.

134 - Mac DONALD A. D., WOOLFE G., BERGEL F., MORRISON A. L., RINDERKNECHT H. - Brit. J. Pharmacol., 1946, 1, p. 4.

135 - MAGEE P. S., KLOETZEL M. C. - J. Org. Chem., 1954, 19, p. 168.

136 - MAGNUS - Arch. of Physiol., 1904, 102, p. 123 et 349.

137 - MAILLARD J., VINCENT M., RAPIN M., VOVANTRI, REMOND G. - Bull. Soc. Chim. Fr., 1967, 6, p, 2110.

138 - MAILLARD J., VINCENT M., REMOND G., VOVANTRI, RAPIN M. - Chimie thérapeutique, 1968, 3, p. 321.

139 - MAO J. C. H., WIEGAND R. G. - Biochem. Biophys. Acta, 1968, 157, p. 404.

140 - MARCOLLET M., BASTIDE P. - J. de Pharmacologie, 1970, 1, p. 53.

141 - MARTONOSI A., DOWLEY J., HALPIN R. A. - J. biol. Chem., 1968, 243, p. 61.

142 - MATELES R. I., ADYE J. C. - Appl. Microb., 1965, 13, p. 208.

143 - MATSUI M., OHNO T., KITAMURA S., TOYAO M. - Bull. Chem. Soc. Jap. 1952, 25, p. 210.

144 - MAURIT M. E., SHTERNBERG R. P., PAKHOMOV A. M. BAZILEWSKAYA G. I., SMIRNOVA G. V., PREOBAZHENSKII N. A. - Zhur. Obshchei Khim., 1960, 30, p. 2256.

145 - MIKAILOV B. M. - J. Gen. Chem. U. S. S. R., 1951, 21 p. 395.

146 - MIKHLINA E. E., RUBSTOV M. V. - Zhur. Obshchei Khim., 1957, 27, p. 691

147 - MILLAR D. B., FRATALLI V., WILLICK E. - Biochemistry, 1969, 8, p. 2416.

148 - MIROCHA C. J., CHRISTENSEN C. M., NELSON G. H. Appl. Microb., 1969, 17, p. 482.

149 - MOUNTER L. A., SHIPLEY B. A., MOUNTER M. A. - J. Biol. Chem., 1963, 238, p. 1979.

150 - NAKANISHI K. - Infrared Absorption Spectroscopy, Practical Holden Day Inc. San-Francisco and Nankodo Company Ltd., Tokyo, 1964.

151 - NELSON W. L., NELSON K. F. - J. Pharm. Sci., 1969, 58, p. 7.

152 - NEUFELD A. H., LEVY H. M. - J. Biol. Chem., 1969, 244, p. 6493.

153 - NIKISHIN G. I., VOROBEV V. D. - Izv. Akad. Nauk., U. S. S. R., Ser. Khim., 1967, 5, p. 1116.

154 - NORMANT H., NORMANT J. F. - Chimie Organique, Masson ed. Paris, 1968, p. 378.

155 - NOZAKHI H., MORI T., NOYORI R., KAWANISI H, - Can. J. Chem., 1967, 45, p. 1804.

156 - PAJOT P., PELL K. S., STURTEVANT J. M. - J. Biol. Chem., 1967, 242, p. 3555.

157 - PEDERSEN P. L., SCHNAITMAN C. A. - J. Biol. Chem. 1969, 244, p. 5065.

158 - PELOUZE - C. R. Acad. Sci., 1844, 19, p. 1219.

159 - PENEFSKY H. S., PULLMAN M. E., DATTA A., RACKER E. - J. Biol. Chem., 1960, 235, p. 3330.

160 - PENEFSKY H. S., WARNER R. C. - J. Biol. Chem., 1965, 240, p. 4694.

161 - PERLES R., COURTOIS J. E. - Traité de Biochimie Générale, Masson Ed., Paris, 1964, 2, p. 428.

162 - PERLMAN D., HOU C. T. - Appl. Microb., 1969, 18, p. 272.

163 - PERRY S. V. - Methods in Enzymology, 1955, 2, p. 582.

164 - PESEZ M., POIRIER P., BARTOS J. - Pratique de l'analyse organique colorimétrique, Masson ED., Paris, 1966, p. 166.

165 - PHILLIPS D. D., JOHNSON A. Wn. - J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, p. 5977.

166 - PILET P. E. - Les phytohormones de croissance, Masson Ed. Paris, 1961, p. 360, 366, 376, 396.

167 - PISKOV V. B. - Zhur. Obshcheĭ Khim., 1962, 32, p. 2046.

168 - PITTS J. N. Jr., LETSINGER R. L., TAYLOR R. P., PATTERSON J. M., RECKTENWALD G., MARTIN R. B.- J. Am. Chem. Soc., 1959, 81, p. 1068.

169 - PLIENINGER H., FRISCHKORN K. - Chem. Commun., 1968, 12, p. 661.

170 - POST R. L., MERRIT C. R., KINSOLVING C. R., ALBRIGHT C. D. - J. Biol. Chem., 1960, 235, p. 1796.

171 - PREOBRAZENSKII N. A., MAURIT M. E., BAZILEVSKYA G. I., SMIRNOVA G. V., ELMANOVICH M. M., VALAKHANOVICH A. I., PERSIYANOVA E. - Zhur. Obshcheĭ Khim., 1960, 30, p. 2250.

172 - PULLMAN ME., MONROY G. C. - J. Biol. Chem., 1963, 238, p. 3762.

173 - PULLMAN M. E., PENEFSKY H. S., DATTA A., RACKER E. - J. Biol. Chem., 1960, 235, p. 3322.

174 - RAO C. N. R. - Chemical applications of infrared sectroscopy, Academic Press, New-York and London, 1963.

175 - RAO Y. S. - Chem. Rev., 1964, 64, p. 354.

176 - Règles de nomenclature pour la chimie organique, Adaptation française, Société Chimique de France Ed., 1968, p. 202.

177 - REGNIER J. - C. R. Acad. Sci. Paris, 1923, 177, p. 558.

178 - REGNIER J. - Méthodes de mesures de l'activité des anesthésiques locaux, Thèse de Doctorat en Médecine, Paris, 1929.

179 - REPKE K. - Drugs and Enzymes, Pergamon Press, Oxford, 1965, p. 65.

180 - ROBERT L., POLONOVSKI J. - Traité de Biochimie générale, Masson Ed., Paris, 1964, 2, p. 34.

181 - ROBERT L., POLONOVSKI J. - Traité de Biochimie générale, Masson Ed., Paris, 1964, 2, p. 41.

182 - ROBERTS J. D., CASERIO M. C. - Chimie organique moderne, traduction française, Ediscience Paris, 1968, p. 410.

183 - ROTH H. - Mikrochim. Acta, 1958, 6, p. 766.

184 - ROTH R. H. et GIARMAN N. J. - Biochem. Pharmacol. 1965, 14, p. 177.

185 - ROTH R. H. , GIARMAN N. J. - Biochem. Pharmacol., 1966, 15, p. 1333.

186 - RUBCOV M. V., JACHONTOV L. N. - Ceskoslov. farm., 1958, 7, p. 520.

187 - RUDALI G. - Concours médical, 1965, 87, p. 4845.

188 - SAVINI E. C. - Brit. J. Pharmacol., 1956, 11, p. 313.

189 - SCHATZMANN H. J. - Biochem. Biophys. Acta, 1965, 94, p. 89.

190 - SCHENCK G. O. - Ger. : 1 063 142, 1959.

191 - SCHENCK G. O., KOLTZENBURG G., GROSSMANN H.- Angew. Chem., 1957, 69, p. 177.

192 - SCHMIDT J., SUQUET M., SALLE J., COMOY P., CALLET G., LE MEUR J. - Chimie Thérapeutique, 1966, 5-6, p. 305.

193 - SCHWERT G. W., WINER A. D. - The enzymes, Academic Press, New-York and London, 1963, 7, p. 127.

194 - SEARCY J. W., DAVIS N. D., DIENER V. L. - Appl. Microb., 1969, p. 622.

195 - SEIDEL J. C. - J . Biol. Chem., 1969, 244, p. 1142.

196 - SEKINE T., BARNETT L. M., KIELLEY W. N. - J. Biol. Chem., 1962, 237, p. 2769.

197 - SEN A. K., TOBIN T., POST R. L. - J. Biol. Chem. 1969, 244, p. 6596.

198 - SHAKHMAZARYAN G. M., SAAKYAN L. A., GARIBYAN V. A., DAUGYAN M. T. - Arm. Khim. Zh., 1966, 19, p. 815.

199 - SHIGEURA H. T. - Antibiotics, 1967, 1, p. 360.

200 - SHISHIDO K., TORII S., KAWANISHI M. - J. Org. Chem. 1964, 29, p. 904.

201 - SHISHIDO K., TORII S., KAWANISHI M. - J. Org. Chem., 1964, 29, p. 2290.

202 - SMITH S. C., DUNN F. W. - J. Med. Chem., 1969, 12, p. 701.

203 - SOLIMAN G., AHMED YOUSSEF H. A. - J. Chem. Soc. 1954, p. 4655.

204 - SREETEN D. H. P. - Clin. pharm. thérap., 1961, 2, p. 359.

205 - STACY G. W., CLEARY J., GORTATOWSKI M. J. - J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, p. 1451.

206 - STACY G. W., WAGNER G. D. - J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, p. 909.

207 - STAMM H. - Arch. Pharm. (Weinheim), 1969, 302, p. 253.

208 - STARON T. - Rev. Path. Gen., 1958, 58, p. 605.

209 - STOBBE H. - Ber., 1893, 26, p. 2312.

210 - STOLL M., DEMOLE E., FERRERO F., BECKER J. Nature, 1964, 202, p. 350.

211 - STRAUB F. B. - Biochem. J., 1940, 34, p. 483.

212 - SUQUET M. - Ann. Chim., Paris, 1953, 8, p. 545.

213 - TAKEDA A., NAGAE H., TORII S., - Mem. Sch. Eng., Okayama Univ., 1967, 2, p. 68.

214 - TANAKA R., ABOOD L. G. - J. Biol. Chem., 1962, 237, p. 2999.

215 - TAUBMAN M. A., ATASSI M. Z. - Biochem. J., 1968, 106, p. 829.

216 - TERMAN L. M., RAZUVAEV G. A., PETUKHOV G. G. - Doklady Akad. Nauk. U. S. S. R. 1961, 136, p. 1349.

217 - THIBAULT P. - Presse médicale, 1966, 74, p. 755.

218 - TOBIAS P., HEIDEMA J. H., LO K. W., KAISER E. T., KEZDY F. J. - J. Am. Chem. Soc., 1969, 91, p. 202.

219 - TOCANNE J. F., ASSELINEAU C. - Bull. Soc. Chim. Fr., 1968, 5, p. 2 103.

220 - TOSCHKOW A. - Antibiotiki, U. S. S. R., 1961, 6, p. 417

221 - TRONCHE P. - Bull. Soc. Pharm. Marseille, 1967, 16, p. 153.

222 - TSEMLIN A. L., NIKONOV G. K., SHVAREV I. F., PIMENOV M. G. - Fed. Proc., 1966, 25, p. 1069.

223 - TYLER W. P., BEESING D. W. - Anal. Chem., 1952, 24, p. 1511.

224 - TZAGOLOFF A. - J. Biol. Chem., 1969, 244, p. 5027.

225 - TZAGOLOFF A., BYINGTON K. H., MAC LENNAN D. H. J. Biol. Chem., 1968, 243, p. 2405.

226 - ULRICH F. - J. Biol. Chem., 1964, 239, p. 3532.

227 - ULRICH F. - Biochem. Biophys. Acta, 1965, 105, p. 460

228 - U. S. Patent n° 3 203 857, 1965.

229 - VAN DUREN, GOLDSMIDT B. L. - J. Med. Chem., 1966, 9, p. 77.

230 - VAN EYS J., SAN PIETRO A., KAPLAN N. O. - Science, 1958, 127, p. 1443.

231 - VINCENT D., SEGONZAC G., SESQUE G. - Rev. Fr. Et. Clin. Biol., 1961, 6, p. 1083.

232 - WADKINS C. L. - J. Biol. Chem., 1960, 235, p. 3 300.

233 - WEATHERALL M. - Enzymes and Drugs action, Ciba foundation Symposium, J. et A. Churchill Ed., London, 1962, p. 117.

234 - WILSON I. B. - QUAN C. - Arch. Biochem. Biophys., 1958, 73, p. 131.

235 - WILSON I. B. - The enzymes, Academic Press, New-York and London, 1960, 4, p. 501.

236 - WIMBURY M. N., SCHMALGEMEIER D. M., HAMBOURGER W. F. - J. Pharmacol. Exper. Ther., 1949, 95, p. 53.

237 - WOLFF M. E., HO W. - J. Org. Chem., 1967, 32, p. 1839.

238 - WOLFF M. E., HO W. - J. Pharm. Sci., 1967, 56, p. 705.

239 - WOLFF M. E., HO W., CHANG H. H. - J. Pharm. Sci., 1968, 57, p. 1450.

240 - ZAKHARKIN L. I. - Izvest. Akad. Nauk., U. S. S. R., 1959, p. 2058.

TABLE DES MATIERES

- INTRODUCTION 1

- RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES 3

- CHAPITRE 1

  - Rappels de notions chimiques et physico-chimiques concernant les lactones 5

- CHAPITRE II

  - Notions chimiques concernant certains types de lactones 11

    - Spirolactones 11

    - Acides lactones carboxyliques 15

- CHAPITRE III

  - Intérêt biologique des lactones 23

    - Enzymologie 23

    - Pharmacologie 26

- RECHERCHES PERSONNELLES 35

  - Chimie 39

- CHAPITRE I

  - Matières premières 41

- CHAPITRE II

  - Réactions et mécanismes réactionnels 49

- CHAPITRE III
  - Produits préparés et mode opératoire 59
  - Etude concernant la préparation d'autres lactones dérivées de cyclanones et d'azacyclanones 76
- CHAPITRE IV
  - Etude des spectres infra-rouges 77
  - Enzymologie 81
- CHAPITRE I
  - Activité lactate déshydrogénasique 87
- CHAPITRE II
  - Activité adénosinetriphosphatasique 95
- CHAPITRE III
  - Activité cholinestérasique 103
  - Pharmacologie 111
- CHAPITRE I -
  - Toxicité aiguë préliminaire 115
- CHAPITRE II -
  - Recherche de l'effet propre et des Effets ganglioplégiques vis-à-vis du spasme nicotinique sur l'iléon isolé de cobaye 117
- CHAPITRE III -
  - Activité spasmolytique sur l'intestin isolé 119
- CHAPITRE IV -
  - Activité parasympatholytique 127
- CHAPITRE V -
  - Etude des effets vasomoteurs par perfusion des vaisseaux de l'oreille du lapin 129

- CHAPITRE VI
  - Effet sur la tension artérielle chez le lapin 135

- CHAPITRE VII
  - Anesthésie locale de surface 139

- CHAPITRE VIII
  - Effet vis-à-vis de l'action contracturante de l'acétylcholine sur la musculature dorsale de la sangsue 143

CONCLUSIONS GENERALES 147

BIBLIOGRAPHIE 151